



TITLE:

# FGF-9の遺伝子同定と生物活性に関する研究( Dissertation\_全文 )

AUTHOR(S):

吉富, 純枝

---

CITATION:

吉富, 純枝. FGF-9の遺伝子同定と生物活性に関する研究. 京都大学, 1998, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

1998-11-24

URL:

<https://doi.org/10.11501/3145750>

RIGHT:

FGF-9 の遺伝子同定と  
生物活性に関する研究

1998

吉富，純枝

# 目 次

緒言 .....	1
第一編 FGF-9 遺伝子のクローニング .....	4
第二編 ヒト FGF-9 に対するモノクローナル抗体の作製と FGF-9 測定用高感度 EIA 系の構築 .....	2 3
第三編 FGF-9 の性状および生物活性 .....	3 4
第一章 FGF-9 の発現部位 .....	3 5
第二章 FGF-9 の分泌機構の検討 .....	3 9
第三章 血小板産生促進作用 .....	4 5
第四章 FGF-9 のガン原性 .....	6 2
総括 .....	7 6
論文目録 .....	7 7
謝辞 .....	7 8
引用文献 .....	7 9

## 緒 言

線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast Growth Factor ; FGF) は、1974年に Gospodarowicz らによりウシ脳下垂体から発見された蛋白性因子で、マウス BALB/c 3T3 細胞などの線維芽細胞に強い増殖促進活性を持つことから名付けられた (1)。FGFは、当初、MW 16,000 の塩基性蛋白 (bFGF、FGF-2) と MW 15,000 の酸性蛋白 (aFGF、FGF-1) として発見された。FGF がヘパリンアフィニティークロマトグラフィーにより効率よく精製できることがわかり、これら FGF の全アミノ酸配列が相次いで報告された。その後の研究で種々の FGF が発見され、これらを総称して FGF ファミリーと呼ばれるようになった。現在までに13種類の FGFファミリー (FGF-1 (2)、FGF-2 (3,4)、FGF-3 (5,6)、FGF-4 (7-10)、FGF-5 (11)、FGF-6 (12,13)、FGF-7 (14,15)、FGF-8 (AIGF, 16)、FGF-10 (17,18)、FGF-11 (19,20)、FGF-12 (19-21)、FGF-13 (19-21)) および本論文で論述する FGF-9 が報告されている。特によく研究されている FGF-1 と FGF-2 は、広く正常組織に分布しており、線維芽細胞だけでなく、血管内皮細胞をはじめとする広範な中胚葉由来細胞や、神経外胚葉由来細胞にも増殖促進作用あるいは分化誘導作用を持つことが明らかにされている。FGF-1、FGF-2、FGF-7 および FGF-8 は精製蛋白として取得され、そのアミノ酸配列をもとに cDNA がクローニングされた因子であり、生体内で産生され機能している。他のメンバーはガン遺伝子としてあるいはそのホモログとして DNA から同定された因子である (5,7-11,13,18-22)。これらの FGF は生体内ではほとんど発現されておらず、胎生期やある種のガンに限定されて発現していることが報告されている (31,44,52-54)。また、FGF ファミリーメンバーの多くはガン原性を持つことが報告されている。

1993年に成尾らにより、ヒトアストロサイトーマ grade III から樹立されたヒトグリオーマ細胞株 NMC-G1 の培養上清中にヘパリンに対して結合性を有しグリア細胞の増殖を促進するグリア細胞活性化因子 (Glia-Activating Factor ; GAF) が見いだされた (23)。グリア細胞は神経系において神経伝達を行っている神経細胞のまわりに存在しており、神経系の高次構造の形成、栄養などの補給による神経細胞の維持および脳損傷時における修復などに関わっていると考えられている (32-34)。発生の過程でグリア細胞が増殖・分化していること (35,36)、脳損傷後の脳組織の修復・再生過程にグリオーシスが認められること (37)、グリア細胞が神経細胞の生存および神経突起の成長に関わっていること (38)、グリア細胞がガン化しうること (39) などから、グリア細胞に作用する増殖因子に関する研究が進められてきた。その結果、線維芽細胞増殖因子 (FGF) (40-42)、上皮成長因子 (EGF) (43)、血小板由来成長因子 (PDGF) (44,45)、Schwannoma-Derived Growth Factor (46)、インターロイキン-1 (IL-1) (47)、IL-2 (48)、endothelin (49) に、グリア細胞に対する増殖活性が認められることが報告されている。さらに、グリア細胞に対する増殖因子としては、他にウシ脳および脳下垂体由来 Glial Growth Factor (GGF) (50)、ウシ脳由来 Glia Maturation Factor (GMF) (51,52)、ラット脳由来 Glia-Promoting Factor (GPF) (53) が報告されているが、これらの構造はわかっていない。

著者らは、精製 GAF 蛋白の N 末端側配列をもとに GAF cDNA をクローニングし、



その配列から GAF が FGF ファミリーの新しいメンバーであることを見いだした。この cDNA を大腸菌で発現させ、得られた組換え型因子を用いて種々の検討を行い、次のような新知見を得た。

1. cDNA 配列から GAF が FGF ファミリーに属する新規因子であることを明らかにし、FGF-9 と命名した。この cDNA を用いて大腸菌で組換え FGF-9 (rFGF-9)を生産、精製し、これがグリア細胞培養上清より得られた天然型 FGF-9 と同等の増殖促進活性を有することを確認した。別途クローン化したラット FGF-9 は、ヒト FGF-9 と208アミノ酸のうち1アミノ酸だけ異なっていた。

2. ヒト FGF-9 に対する中和活性を有するモノクローナル抗体を作製し、さらに FGF-9 に対する高感度 EIA 系の構築を行った。

3. FGF-9 の性状 および 生物活性を検討した。

- 1) 成熟ラットでは、FGF-9 遺伝子は脳と腎臓に、FGF-9 蛋白は小脳にそれぞれ限局的に発現されていた。
- 2) FGF-9 の分泌にはN末端のアミノ酸が必要であることが示唆された。
- 3) FGF-9 が巨核球系前駆細胞を増殖させることによる血小板産生促進作用を有することを見いだした。
- 4) FGF-9 がガン原性を有することを見いだした。

以下、これらの成績について三編に分けて論述する。

本論文中で使用した略号は以下の通りである。

aFGF	酸性線維芽細胞増殖因子
bFGF	塩基性線維芽細胞増殖因子
bp	ベースペア
CS	ウシ血清アルブミン
DHFR	ジヒドロ葉酸還元酵素
DMEM	ダルベッコ改変MEM培地
EIA	酵素免疫反応
EGF	上皮成長因子
EPO	エリスロポエチン
FCS	ウシ胎児血清
FGF	線維芽細胞増殖因子
FGFR	線維芽細胞増殖因子受容体
GAF	グリア細胞活性化因子
HUVE	ヒトさい帯血管内皮細胞
IL	インターロイキン
IMDM	イスコフ改変ダルベッコ培地
kDa	キロダルトン
KGF	表皮細胞増殖因子
MK-CSF	巨核球コロニー刺激因子
MK-POT	巨核球増幅因子
MoAb	モノクローナル抗体
MTX	メトトレキセート
MuLV	マウス白血病ウィルス
MW	分子量
NGF	神経成長因子
PAGE	ポリアクリルアミド電気泳動
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	血小板由来成長因子
TGF	トランスフォーミング成長因子

## 第一編 FGF-9 遺伝子のクローニング

グリア細胞は神経系において神経伝達を行っている神経細胞のまわりに存在しており、神経系の高次構造の形成、栄養などの補給による神経細胞の維持 および 脳損傷時における修復などに関わっていると考えられている (32-34)。それゆえ、グリア細胞の増殖因子は、神経系の形成や維持に重要な役割を果たしていると考えられる。また、脳には脳血液関門が存在し、高分子物質の脳内への搬入に制約があるため、神経細胞やグリア細胞の増殖因子は脳内で産生されている可能性が高い。成尾らは、これらの観点からグリア細胞の増殖因子について研究を進め、ヒト グリオーマ細胞株 NMC-G1 培養上清中からヘパリンに対して結合性を有し、ラット初代培養グリア細胞に増殖活性を示す新規因子、Glia-Activating Factor (GAF)、を発見した (23)。

GAFは、NMC-G1 培養上清から ヘパリンアフィニティーカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー、ヘパリンアフィニティー高速液体カラムクロマトグラフィー、逆相高速液体カラムクロマトグラフィー (RP-HPLC) の組合せにより精製され、還元条件下の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で 30kDa、29kDa および 25kDa の 3 種類の分子量を与えた。これらの分子量は、非変性条件下でのゲル濾過カラムクロマトグラフィーの溶出位置より算定した分子量  $26,000 \pm 3,000$  とよく一致していることから、各々の GAF はサブユニット構造をとっておらず単一のポリペプチド鎖であることが示唆された。糖鎖の解析から、3 種類の GAF にはいずれも N-グルコシド結合型糖鎖が結合していることが明らかにされた。さらに、これら 3 種類の GAF の N 末端アミノ酸配列を解析して NBRF-PIR のデータベースを検索したところ、類似するものはなく、3 種類の GAF は新規因子であることが明らかになった。3 種類の GAF はラット初代培養グリア細胞に対して同程度の生物学的比活性を有しており、ラット初代培養グリア細胞に対する  $ED_{50}$  は  $10^{-11} M$  であった。精製 GAF は、オリゴデンドロサイトタイプ 2 アストロサイト (O-2A) 前駆細胞、マウス BALB/c 3T3 線維芽細胞 および ラット副腎褐色細胞腫由来 PC-12 細胞株の増殖を促進したが、ヒトさい帯血管内皮 (HUVE) 細胞の増殖は促進しないことから、脳損傷後の組織の修復 および 再生時にオートクライン様に作用すると推測された。

第一編では、上述のような興味深い性質を有する GAF の全構造の解明を行い、さらに FGF-9 の生物活性の検討を行うために得られた cDNA をもとに組換え FGF-9 を作成したことを論述する。



## 1. 実験材料と方法

### 1) オリゴヌクレオチドの合成 および Polymerase Chain Reaction (PCR)

精製した 30kDa の GAF の N 末端アミノ酸配列をもとに、その配列をコードする以下のオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチド 1 (sense プライマー) は、30 kDa GAF の <sup>4</sup>Val-Gly-Asn-Tyr-Phe-<sup>9</sup>Gly に対応する配列に BamHI site を加えたもので、5'-AAGGATCCGTIGGIAA(T/C)TA(T/C)TT(T/C)GG-3' の配列を持つ。オリゴヌクレオチド 2 (antisense プライマー) は、30kDa GAF の <sup>14</sup>Val-Pro-Phe-Gly-Asn-<sup>19</sup>Val に対応する配列に EcoRI site を加えたもので、5'-AAGAATTCAC(A/G)TTICC(A/G)AAIGGIAC-3' の配列を持つ。

PCR のプライマーとしてオリゴヌクレオチド 1 および 2 をそれぞれ 260ng 用いた。反応には Gene Amp<sup>TM</sup> (Cetus) を 100 μl の系で用いた。PCR の鑄型にはヒト染色体 DNA 1 μg を用い、2.5U の Taq DNA ポリメラーゼを用い、94℃ 1 分、50℃ 2 分、72℃ 3 分のサイクルを 25 回繰り返した。予想される大きさの PCR の産物を M13 ベクター、mp10、mp11、にサブクローニングし、di-deoxy 法でその塩基配列を決定した。

### 2) FGF-9 cDNA のスクリーニング

pCD ベクターに組み込まれたヒト包皮細胞由来 cDNA ライブラリーは、東京大学医学部 岡山博人博士より供与を受けた (146)。λgt10 をベクターとしたラット脳 cDNA ライブラリーは、神戸大学農学部 小野功貴博士より供与を受けた (147)。FGF-9 cDNA を濃縮した cDNA ライブラリーの構築には FGF-9 cDNA の 3' 側非コード領域のアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成し、これをランダムヘキサマーと混合してプライマーとし、NMC-G1 mRNA あるいはラット脳 mRNA を鑄型として cDNA 合成を行った (28)。特異的プライマーの量は、モル比でランダムヘキサマーと等量にした。特異的プライマーの配列は、ヒトに対しては 5'-AAGGGCTCAAGTGAAGAAATTGTC-3'、ラットに対しては 5'-AAGGGCTCAAGTGAAGACACTGTC-3' とした。

オリゴヌクレオチドプローブを用いた場合は、0.1% SDS、170 μg/ml 熱変性サケ精子 DNA を含む 5 x SSPE、5 x Denhardt's 溶液中で 55℃ 一晩ハイブリダイゼーションを行い、0.1% SDS を含む 5 x SSC 溶液で 60℃ 1 時間 フィルターを洗った。DNA フラグメントをプローブとして用いた場合は、0.1% SDS、170 μg/ml 熱変性サケ精子 DNA、50% ホルムアルデヒドを含む 5 x SSPE、5 x Denhardt's 溶液中で、42℃ 一晩反応を行い、0.1% SDS を含む 0.2x SSC 溶液で 65℃ 30 分間 フィルターを洗った。cDNA の塩基配列は di-deoxy 法で決定した。

### 3) COS7 細胞への遺伝子導入

COS7 細胞を用いて DEAE-dextran 法 (28) にて一過性の FGF-9 遺伝子の発現を行った。6x10<sup>5</sup> 個の COS7 を 60mm の組織培養用ディッシュ (Falcon) に播種した。培地には、10% NU-Serum (Collaborative Research) を含む IMDM (SIGMA) を用いた。翌日、トランスフェクションの 1 時間前に培地を交換し、pGAF1 (63) と DEAE-dextran (終濃度 100 μg/ml、SIGMA) および chloroquine disphosphate (終濃度 100 μM、SIGMA) と混合したもの

を細胞にかけて 37℃ で 4 時間培養した。さらに、10% DMSO を含む PBS で 2 分間刺激した後、10% NU-Serum IMDM 培地に交換して 3 日間培養した。培養上清と細胞抽出液のラット初代培養グリア細胞に対する増殖活性を測定した。細胞抽出液は、シャーレからセルスクレーパーでかき取った細胞を 1 ml の PBS に懸濁したものを氷冷下で超音波処理 (90sec) を行い、15,000 rpm で 20 分間遠心した上清を用いた。

### 4) 細胞増殖活性の測定

ラット初代培養グリア細胞に対する増殖活性 (GAF 活性) は、以下のようにして測定した (23)。ラット脳皮質由来アストロサイトは胎生 17 日目の SD ラット (Charles River) 脳から単離し、10% 非働化 ウシ 胎児血清 (FCS、三菱化学) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM、Flow) で初代培養を行った (23)。ほとんどの細胞がタイプ 1 アストロサイトの形態を示していた。ラット初代培養グリア細胞 (3x10<sup>3</sup> cells/well) を、10% の FCS を含む DMEM 培地で 96 穴平底プレート (NUNC) に播種し、2~3 日培養後、各ウェルから 75 μl の培地を廃棄し 175 μl の DMEM を添加した。2~3 日培養後、各ウェルより 20 μl の培地を廃棄し 1.25% FCS を含む DMEM で希釈したサンプルを 20 μl 添加し、さらに一晩培養した。37kBq/well のトリチウム (<sup>3</sup>H)-チミジン (5Ci/mmol、1mCi/ml、RCC Amersham) を添加し、6 時間後の細胞をガラスファイバーフィルター (大日本製薬(株)) 上に集め、その放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した (23)。

マウス BALB/c 繊維芽細胞に対する増殖活性は以下のようにして測定した。EGF に対する反応性の弱い BALB/c 3T3 クローン A31-1-1 細胞 (2x10<sup>3</sup> cells/well) (66) を 96 穴平底プレートに播種した。翌日培地を 0.5% FCS DMEM に置換し、3 日間培養した。さらに、サンプルを添加して 2 日間培養した。18.5kBq/well の <sup>3</sup>H-チミジンを添加し、6 時間後に細胞が取り込んだ放射活性を測定した。

ラット副腎褐色細胞腫由来 PC-12 細胞に対する増殖活性は以下のようにして測定した。サンプルを 1% の非働化したウマ血清 (Flow) を含む RPMI1640 培地 (Flow) にて希釈し、96 穴平底マイクロプレートに 50 μl ずつ添加した。ここに、細胞 (5x10<sup>4</sup> cells/well) を加え、2 日間培養した。18.5kBq/well の <sup>3</sup>H-チミジンを添加し、6 時間後に細胞が取り込んだ放射活性を測定した。

ラット初代培養平滑筋細胞に対する増殖活性は、以下のようにして測定した。ラット初代培養平滑筋細胞を 10% FCS を含む DMEM 培地で 96 穴平底マイクロプレートに 3000 cells/well 播種し、翌日 0.5% FCS を含む DMEM 培地に交換した。2 日間培養後、各ウェルより 20 μl の培地を廃棄し、0.1% BSA を含む DMEM 培地で希釈したサンプルを 20 μl 添加して 1 晩培養した。37kBq/well の <sup>3</sup>H-チミジンを添加し、6 時間後の細胞をガラスファイバーフィルター上に集め、その放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

ヒトさい帯由来血管内皮細胞 (HUVE) に対する増殖活性は、以下のようにして測定した (23)。HUVE 細胞は Kan 等の方法に従って単離し、2.5% FCS、2 ng/ml FGF-2 (58) を含む GIT 培地 (日本製薬(株)) にて維持した。HUVE 細胞 (2x10<sup>3</sup> cells/well) を 2.5% FC



Sを含むGIT培地で96穴平底プレートに播種し、翌日サンプルを添加した。3日間培養後、培地を廃棄し、PBSで希釈した1 mg/mlの3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT、SIGMA) 溶液100  $\mu$ lを添加して4時間培養した。さらに100  $\mu$ lの10% SDS、0.01N HCl溶液を添加して一晩培養した後、590nmの吸収を測定した。

ラット神経細胞に対する増殖活性は、以下のようにして測定した(23)。ラット17日目の胎児脳から神経細胞を単離し、DMEM/F12/N2培地で96穴平底プレートに播種し(6000cells/well)、サンプルとともに3～5日間培養した。終濃度1 mg/mlになるようにMTT溶液を添加して4時間培養した。さらに100  $\mu$ lの10% SDS、0.01N HCl溶液を添加して一晩培養し、590nmの吸収を測定した。

#### 5) 用いた抗体の作製法

ウサギ(JW、14週令、2.7～2.8kg)にフロイント完全アジュバント(Difco)に1 mgのFGF-9 N末端ペプチド(FGF-9のN末端アミノ酸5番目から12番目)あるいはFGF-9 C末端ペプチド(FGF-9のC末端アミノ酸16残基識)を懸濁したものを皮下接種した。以後2週間間隔で3回フロイント不完全アジュバント(Difco)に1 mgのFGF-9 N末端ペプチドあるいはFGF-9 C末端ペプチドを懸濁したものをそれぞれ皮下接種した。最終免疫の1週間後に血清を採取して、IgG画分をプロテインAカラム(ファルマシア)を用いて精製した。

#### 6) FGF-9のウェスタンブロットによる検出

遺伝子を導入したCOS7細胞の培養上清あるいは細胞抽出液を0.4 M NaClを含む20mM Tris-HCl (pH7.6)で洗浄したヘパリンセファロース CL-6B(ファルマシア)にかけ、1.5mlの2M NaClを含む20mM Tris-HCl (pH7.6)で溶出した。溶出液にトリクロロ酢酸(TCA)を10%になるように加え、0℃30分後に生じた沈澱を遠心して集め、電気泳動用試料バッファーに溶解したものを検体として用いた。Laemmliらの方法(29)にしたがって、12.5%ポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行った。泳動された蛋白は20%メタノールを含むSDS-PAGE泳動緩衝液系でニトロセルロース膜に乾式ブロッティング装置(アトー社)を用いて転写した(0.2A、40min)。ニトロセルロース膜は、150mM NaCl、0.05% Tween 20を含む10mM Tris-HCl (pH8.0) (TBST)で5分間ずつ2度洗浄し、25% Block-Ace(大日本製薬)を含むTBST中で1時間ブロッティングを行った。TBSTで3回洗浄後、1% BSAを含むTBSTで1000倍に希釈したウサギ抗FGF-9 N末端ペプチド抗体(FGF-9のN末端アミノ酸5番目から12番目を認識)あるいはウサギ抗FGF-9 C末端ペプチド抗体(FGF-9のC末端アミノ酸16残基を認識)を室温で2時間反応させた。TBSTで3回洗浄後、1% BSAを含むTBSTで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG(Promega)を室温で2時間反応させた。ニトロセルロース膜をTBSTで3回洗浄後、発色剤(Prot Biot Western Blot AP Starter System、Promega)を加えて15分間反応させ、免疫複合体を検出した。

#### 7) FGF-9産生CHO細胞株の樹立

Abelson マウス白血病ウイルス(MuLV) -LTR プロモーターの支配下にFGF-9 cDNAを、SV40複製開始点プロモーターの支配下にハムスターDHFR cDNAを同一方向に連結したプラスミドpDGAF1は、pGAF1とpTB485(30)から構築した。このプラスミドはpGAF1のインサートの全てのcDNAを含んでいる。DHFR<sup>+</sup>CHO細胞は、5% FCS Ham's F12培地(Flow)で培養した。この細胞に、pDGAF1 10  $\mu$ gをリン酸カルシウム法(132)でトランスフェクトした。2日間増殖培地で培養した後、96穴マイクロプレートに35  $\mu$ g/mlプロリンを含む5% FCS DMEM培地に置換し、以後この選択培地で培養した。細胞は2～3日毎に培地を交換し、3週間後、形成されたコロニーを24穴プレート(Flow)に移した。さらに選択培地中のメトトレキセート(MTX、Sigma)濃度を段階的に上昇させ、MTX耐性、DHFR<sup>+</sup>CHO細胞を選択した。これらの細胞の培養上清中のFGF-9活性を測定し、FGF-9高産生株、CDGAF4を選別した。選択後は5% FCS、35  $\mu$ g/mlプロリンを含むDMEM培地で培養した。

#### 8) CHO細胞が産生するFGF-9の精製

組換えFGF-9(rFGF-9)をCDGAF4細胞の培養上清から精製した。精製方法は天然のFGF-9と同じ方法を用いた(23)。CDGAF4細胞をローラボトルでセミコンフルエントに増殖させた後、0.5% FCSを含むHam's F12/DMEM(1:1)培地に置換して、2日後に培養上清を集めた。NaClを0.1Mに、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)を1 mMになるように添加し、ヘパリンセファロース CL-6Bカラムにかけた。2M NaCl、0.1% CHAPSを含む20mM Tris-HCl (pH7.6)で溶出された画分を、Sephacryl S200ゲル濾過カラムにかけた。FGF-9を含む画分をプールし、ヘパリン-HPLCカラム(Shodex HR894、Showadenko)にかけ、0.4～2M NaClの濃度勾配で溶出した。FGF-9は0.8M NaClで溶出された。これをさらにC<sub>4</sub> RP-HPLCカラムにかけ、アセトニトリルの濃度勾配で溶出した。FGF-9活性は抗FGF-9 C末端ペプチド抗体を用いたウェスタンブロットで検出した。最終的に溶出された蛋白について、グリア細胞に対する増殖促進活性を有することを確認した。精製された蛋白のN末端アミノ酸配列は、プロテインシークエンサー(model 473A、Applied Biosystems)で解析した。また、約20  $\mu$ gの精製蛋白を0.5U/mlのN-glycanase (peptide:N<sup>4</sup>-[N-acetyl- $\beta$ -glucosaminyl] asparagine amidase、Genzyme)、0.2% SDS、1% Nonidet P-40、20mM EDTA、20mM Tris-HCl (pH8.0)で37℃24時間反応させた。消化された蛋白はSDS-PAGEにかけて抗FGF-9 N末端ペプチド抗体を用いたウェスタンブロットで解析した。

#### 9) 大腸菌が産生するFGF-9の精製

大腸菌発現用のプラスミドは、以下に記載する方法で構築した。プラスミドpGAF1を制限酵素KpnIとBamHIで切断して、1.25kbのFGF-9 cDNA断片を単離した。一方、T7プロモーターを含むプラスミドpET3c(149)を制限酵素NdeIとBamHIで切断して38bp DNAを除去した後、前記のFGF-9 cDNA 1.25kb断片と、FGF-9の4番目のアミノ酸Leuの前に翻訳開始コドン(ATG)が入るように合成したDNA断片(NdeI



-KpnI) を挿入して、T7 プロモーターの支配下に N 末端アミノ酸が 3 個欠失した FGF-9 N3 分子を発現させる発現用プラスミド pETGAF1 を構築した。また、プラスミド pGAF1 を制限酵素 DraI-BamHI で切断し、1.2kb の cDNA 断片を単離した。T7 プロモーターを含むプラスミド pET3c を制限酵素 NdeI と BamHI で切断し、38bp の DNA を除去した後、前記の FGF-9 cDNA 1.2kb 断片と FGF-9 の 34 番目のアミノ酸 Ser の前に翻訳開始コドン (ATG) が入るように合成した DNA 断片 (NdeI-DraI) を挿入して、T7 プロモーターの支配下に N 末端アミノ酸が 33 個欠失した FGF-9 N33 分子を発現させる発現用プラスミド pETGAF25 を構築した。pETGAF1 あるいは pETGAF25 を大腸菌 MM294 (DE3)/pLysS (150) に導入した。これらの菌を LB 培地で培養して  $A_{600}=1$  になった時、0.4mM のイソプロピル  $\beta$ -Dチオガラクトシドを添加して rhFGF-9 の産生を誘導し、さらに 3 時間培養した。菌体を集めて、氷冷下 2 mM PMSF、1 mM EDTA、100  $\mu$ g/ml Lysozyme、0.3M NaCl を含む 20mM Tris-HCl (pH7.6) に懸濁し、ビーズ (MAHLKOERPER MK-2GX (DR) 0.25-0.5mm  $\phi$ ) を添加、攪拌によって菌体を破碎した (0℃、4 分攪拌、2 分放置を 6 回)。混合液を遠心し、得られた上清に対して硫酸を 20% まで加え、4℃で 30 分間放置後遠心した。その上清に対して硫酸を 70% まで加え 4℃で 30 分間放置後遠心した。氷冷下、沈澱を 50ml の 0.1M NaCl、0.1% CHAPS を含む 20mM Tris-HCl (pH7.6) に溶解し、0.15M NaCl、0.1% CHAPS を含む 20mM Tris-HCl (pH7.6) で平衡化した DEAE-Toyoperl 650S カラム (東ソー) にかけた。カラムは、0.15M NaCl、0.1% CHAPS を含む 20mM Tris-HCl (pH7.6) で洗浄した。素通り画分をフィルター濾過して、0.2 M NaCl を含む 10mM Tris-HCl (pH7.6) で平衡化した ヘパリンカラム (Shodex HR-894) にかけた。カラムを 0.2M NaCl を含む 10mM Tris-HCl (pH7.6) で洗浄し、0.2M から 2M の NaCl 濃度勾配で溶出した。

#### 1 0) 塩基配列の受け入れ番号

今報告中のヌクレオチド配列は DDBJ、EMBL、GenBank ヌクレオチドシーケンデータベースに、ヒト FGF-9 mRNA は D14838、ラット FGF-9 mRNA は D14839 で登録されている。

## 2. 実験成績

### 1) ヒト GAF cDNA のクローニング

精製された GAF 蛋白の N 末端アミノ酸配列をもとに作成したオリゴヌクレオチド 1 およびオリゴヌクレオチド 2 を用いて、ヒト染色体ゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。アミノ酸配列より予想される 63bp の反応産物を M13ベクターにサブクローニングしてシーケンスを行ったところ、この塩基配列は 30kDa GAF の N 末端アミノ酸配列に対応していた。決定した配列は、5'-GGATCCGTGGGGAAGTATTTTCGGGGTG CAGGATGCGGTCCCCTTCGGCAACGTGTGAATTC-3' であった。この配列をもとにして 2 本のオリゴヌクレオチドプローブ 5'-TGGGGAAGTATTTTCGGGGTG CAGGATG CCG-3' および 5'-ACGTTGCCGAAGGGGACCGCATCCTGCACC-3' を合成した。これをプローブとしてヒト包皮細胞 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、2 つのポジティブクローン (pGAF1、2) を得た。これらの 2 つのクローンは cDNA インサートの長さがともに 1.5kb であったことから、同じ塩基配列を持つものと思われる。pGAF1 の cDNA インサートの塩基配列を決定したところ GAF 蛋白のアミノ酸配列をコードしていたことから、pGAF1 は GAF 蛋白をコードする cDNA であることが結論された。

### 2) ヒト GAF cDNA の構造と予想される蛋白質 および FGF-9 の命名

pGAF1 の構造解析を行った (Fig.1)。cDNA は 1493bp からなり、5' 側および 3' 側非翻訳領域、ポリ A 鎖と 624bp におよぶコード領域が存在し、208 アミノ酸からなる蛋白をコードしていた。このコード領域の最初の ATG コドンの上流 147bp に同じ読み取り枠で終止コドンが存在することから、この ATG コドンから翻訳が開始されると考えられた。さらに GAF の cDNA 構造を確定するために、pGAF1 の cDNA の 3' 側の配列をもとに GAF cDNA を濃縮した NMC-G1 cDNA ライブラリーを作製してスクリーニングを行ったところ、6 個のポジティブクローンを得た。これらのうち、クローン H6-2 のコード領域の塩基配列を決定したところ、pGAF1 と全く同じ塩基配列であった。NMC-G1 の培養上清から精製された GAF 蛋白には分子量の異なる 3 種類の分子種 (30kDa、29kDa、25kDa) が存在する (23)。これら 3 種類の蛋白の N 末端側アミノ酸配列は、すべて得られた cDNA のコードする配列に含まれていた。また、GAF のアミノ酸配列中には N 結合型の糖鎖付加部位 ( $^{79}$ Asn-Gly-Thr) が一カ所存在していた。これは、天然の GAF には分子量約 3 kDa の N 結合型糖鎖が付加しているという知見 (23) と一致した。得られた cDNA の 3' 側非コード領域には、ATTTATTTA 配列が存在していた。この配列は、多くのサイトカインやプロトオンコジーン mRNA などの一過性に発現される遺伝子の多くに存在し、mRNA の安定性に関わる配列と考えられている (31)。

**Fig. 1** cDNA structure and deduced amino acid sequence of human FGF-9. The nucleotide sequence of pGAF1 cDNA and deduced amino acid sequence are shown. The amino acid sequence is described with a one-letter code. N-terminal sequences of purified GAF protein are indicated by arrows, and the boxed sequence NGT is the canonical N-type glycosylation site. AATAAA is a polyadenylation signal sequence, and the ATTATTTA sequence is thought to be involved in mRNA destabilization.

FGF-9 DILSQS  
INT-2 LQSGKPRPPGKGVQPRRRRQKQSPDNLEPSHVQASRLGSQLEASAH  
FGF-5 VTVPEKKNPPSPIKSKIPLSAPRKNTNSVKYRIKRFEG

**Fig. 2** Alignment of amino acid sequences of FGF-9 and other members of the FGF family. Amino acid sequences of the human FGF family are aligned, and well-conserved amino acids are shaded.



GAFのアミノ酸配列と既知の蛋白との相同性を検索した結果、GAFはFGFファミリーの各メンバーと約30%の相同性を持つことが明らかとなり(2-9,11-16,22,25,27)、FGF-9と命名した(Fig.2)。図中で、得られたFGF-9のアミノ酸配列を、7つのFGFファミリーメンバー、FGF-1、FGF-2、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7を最も相同性が高くなるように並べた。ファミリーメンバー間で保存されている2つのCys残基や、その他保存されているいくつかのアミノ酸配列がFGF-9でも保存されていた。

FGF-9のhydropathy plot解析(144)を行った(Fig.3)。FGF-9のN末端には、疎水性のアミノ酸のクラスターからなる典型的なシグナル配列は見いだされなかった(148)。この点で、FGF-9はFGF-1やFGF-2(2-4)と似ていた。

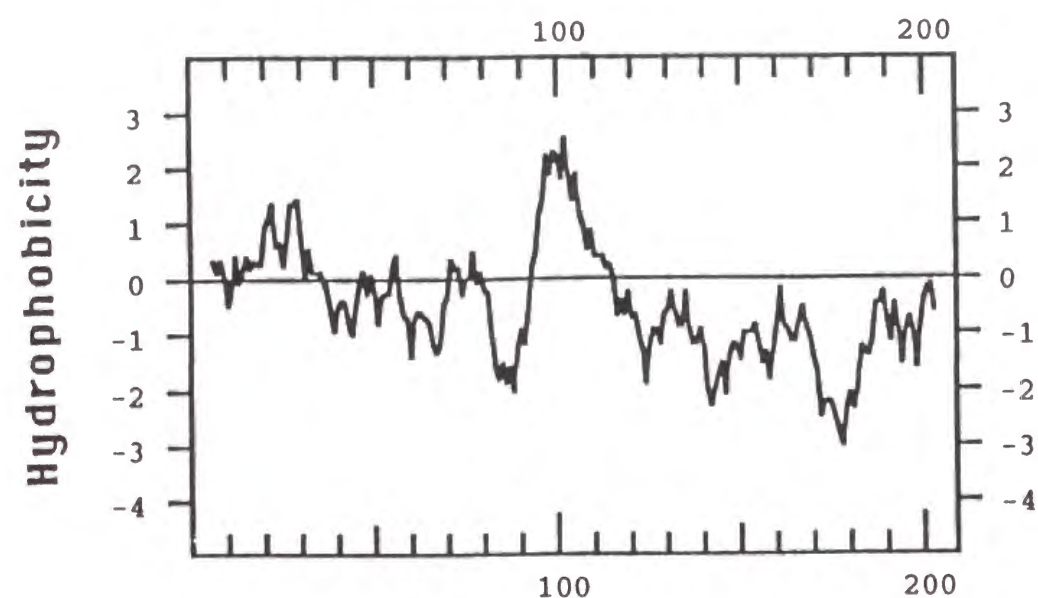


Fig. 3 Hydropathy plot analysis of FGF-9 protein. The hydrophobicity index was calculated by the method of Kyte and Doolittle

### 3) FGF-9 cDNA の COS7 細胞への導入

クローニングしたcDNAを動物細胞で発現させ、その生物活性を調べた。pGAF1は、動物細胞発現用のベクターであるpCDベクターにFGF-9 cDNAを挿入したものである。pGAF1をCOS7細胞に導入して一過性に発現させ、その細胞培養上清中あるいは細胞抽出液中のFGF-9活性を検討した(Fig.4 A、B)。pGAF1を導入したCOS7細胞の培養上清に、ラット初代培養グリア細胞に対する増殖促進活性が検出された。細胞抽出液中に検出された増殖促進活性はpGAF1を導入していない細胞でも検出されており、他の因子によるものと考えられた。FGF-9 C末端ペプチド抗体を用いたウェスタンブロット解析によって、pGAF1を導入したCOS7細胞の培養上清中に、約30kDaのFGF-9が検出された(Fig.4 C)。細胞抽出液中にはFGF-9のバンドは検出できなかった。同様の結果は、抗FGF-9 N末端ペプチド抗体を用いたウェスタンブロット解析でも得られた。これらの結果から、pGAF1に含まれるcDNAが増殖促進活性を有する蛋白FGF-9(GAF)をコードしていることおよびFGF-9が細胞外へ分泌される蛋白であることが確認された。

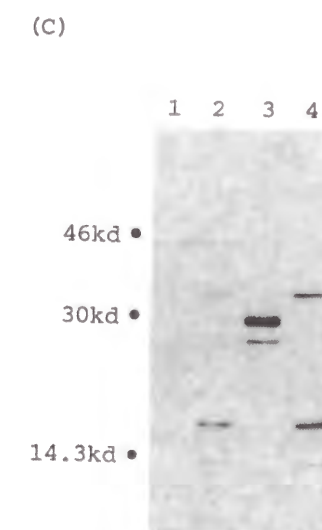
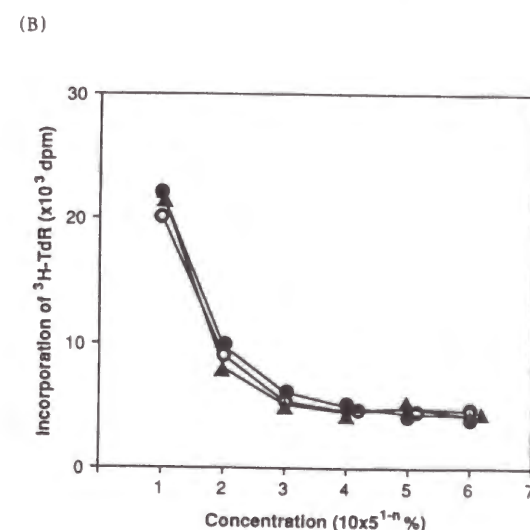
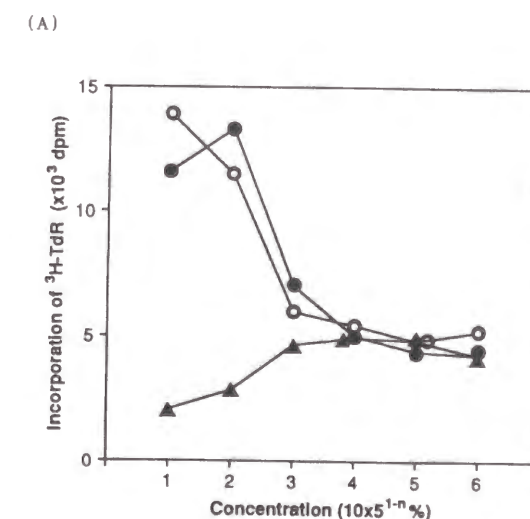
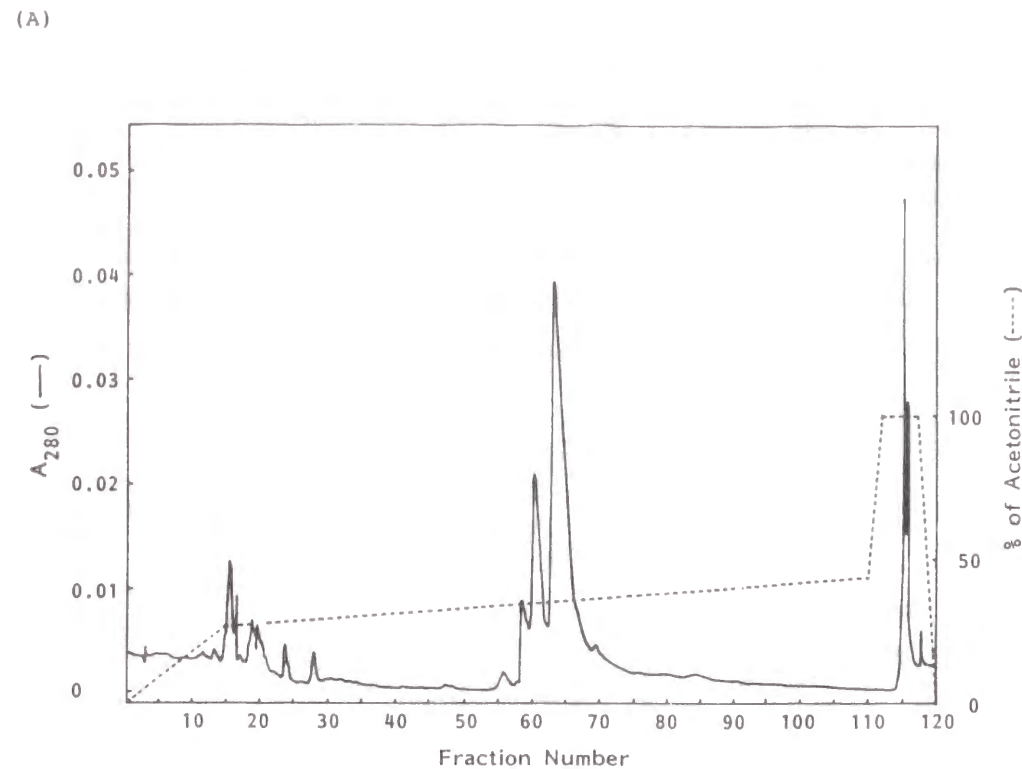
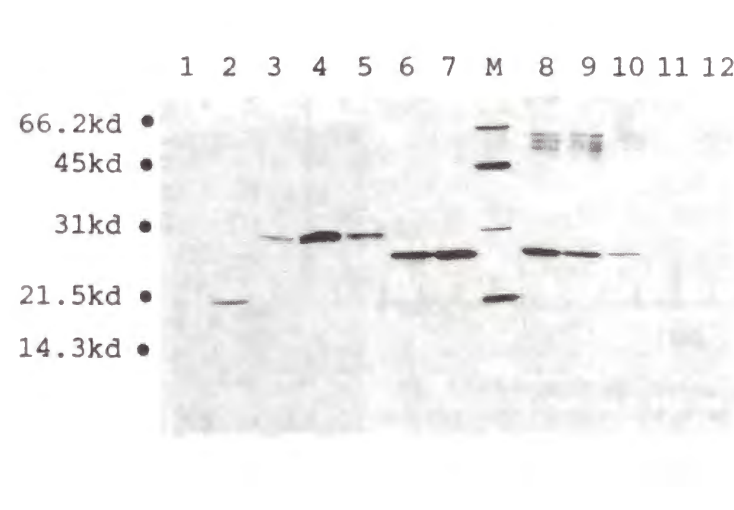


Fig. 4 Detection of FGF-9 in COS cells after cDNA transfection. COS cells were transfected with pGAF1, and mitogenic activity against glial cell in culture supernatant (A) and cell lysate (B) was measured. Samples were serially fivefold diluted and were added to 1/10 volume of the assay mixture.  $\Delta$ , no DNA;  $\circ$ , 2  $\mu$ g of pGAF1;  $\bullet$ , 10  $\mu$ g of pGAF1. The culture supernatant and cell lysate of DNA-transfected COS cells were applied to a heparin-Sepharose CL-6B column, and fractions eluted with 2 M NaCl were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. (C) FGF-9 protein was detected by Western blotting using anti-FGF-9 C-terminal peptide antibody. Lanes: 1 and 3, culture supernatant of mock transfected and pGAF1-transfected cells, respectively; 2 and 4, cell lysate of mock transfected and pGAF1-transfected cells, respectively.



(B)



(C)

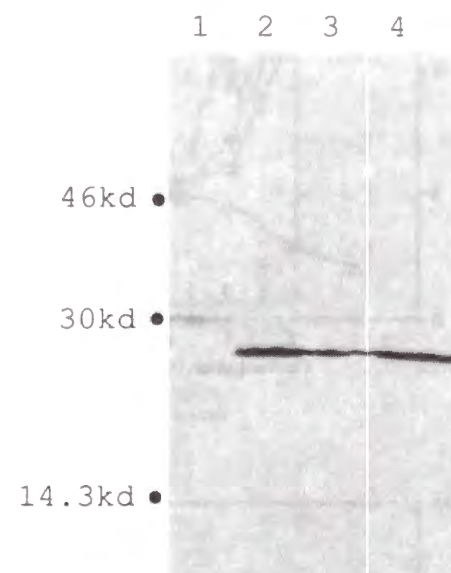


Fig. 5 . Purification of FGF-9 produced in CDGAF4 cells. (A) Reverse-phase HPLC of heparin HPLC eluate; the final step of purification. Heparin HPLC-eluted fractions were applied to a Vydac C4 column (0.46 by 25 cm; Vydac), and proteins were eluted with a gradient of acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid (0.8 ml/min/fraction). The effluent was monitored for  $A_{280}$ . The fractions were collected in tubes containing 20  $\mu$ l of 5% (wt/vol) CHAPS and 100  $\mu$ l of 0.5 M HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid) (pH 7.2). Acetonitrile in the fractions was removed by a Speed Vac Concentrator (model 290; Savant). The volume of each fraction was then adjusted to 0.5 ml with distilled water. (B) Gel electrophoresis pattern of eluted fractions. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of each fraction (3  $\mu$ l) upon reverse-phase HPLC was carried out with a 12.5% polyacrylamide gel under reducing conditions. Proteins were stained by a silver-staining method. Lane M, low-molecular-size-marker proteins (Bio-Rad Laboratories) (bovine serum albumin, 66.2 kDa; ovalbumin, 45 kDa; carbonic anhydrase, 31 kDa; soybean trypsin inhibitor, 21.5 kDa; lysozyme, 14.4 kDa; 50 ng each); lanes 1 through 12 are fractions 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, and 69, respectively. (C) *N*-glycanase treatment of the purified proteins. Samples were treated with *N*-glycanase as described in the text. The digested proteins were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and detected by Western blotting using anti-FGF-9 N-terminal peptide antibody. Lanes 1 and 3, 30- and 27-kDa proteins without treatment; lanes 2 and 4, 30 and the 27-kDa proteins with *N*-glycanase treatment.

#### 4) CHO 細胞が産生する組換え蛋白の精製

FGF-9 cDNA とハムスターの DHFR cDNA を発現するプラスミド pDGAF1 を構築した。DHFR<sup>-</sup> CHO 細胞に pDGAF1 をトランスフェクションして、DHFR<sup>+</sup> CHO 細胞を選択した。さらに、MTX の濃度を段階的に上昇させて、導入した遺伝子を増幅した。10  $\mu$ M MTX 耐性株の中から、培養上清中の FGF-9 活性が強い細胞株、CDGAF4 細胞を選択した。ウェスタンブロット解析の結果、CDGAF4 細胞が産生する FGF-9 は主に培養上清中に分泌されていることがわかった (データ不載)。天然の FGF-9 の精製法と同じ方法 (23)、すなわち、ペパリンカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー、ペパリン HPLC カラムクロマトグラフィー、RP-HPLC カラムクロマトグラフィーを用いて、CDGAF4 細胞の培養上清から FGF-9 を SDS-PAGE 上で単一なバンドを与えるまで精製した。最終ステップの逆相 HPLC カラムの溶出パターンと溶出物の SDS-PAGE のパターンを Fig.5 に示した。CDGAF4 細胞が産生する FGF-9 は 21kDa、27kDa、30kDa の 3 つのピークに分かれ、これらの蛋白の存在比は 1 : 20 : 5 であった。5 L の培養上清から 600  $\mu$ g の FGF-9 が精製された。これらのピーク画分はすべてラット初代培養グリア細胞に対する増殖促進活性を持っており、FGF-9 の C 末端アミノ酸ペプチドを認識する抗体で検出された。30kDa と 27kDa の蛋白の N 末端アミノ酸配列はともに Ala-Pro-Leu-Gly-Glu-Val-Gly- で、第 2 番目のアミノ酸である Ala から始まっていた。

#### 5) 大腸菌が産生する組換え蛋白の精製

ヒトグリオーマ細胞由来 NMC-G1 より精製された FGF-9 分子は 30kDa、29kDa および 25kDa であった (23)。このうち 30kDa と 25kDa を構成するポリペプチドを大腸菌で発現、生産させ、その産物の精製を行った。

大腸菌の T7 プロモーターの支配下に N 末端から 3 アミノ酸を欠く分子種 (FGF-9 N3) および 33 アミノ酸を欠く分子種 (FGF-9 N33) を発現させる発現用プラスミド pETGAF1 および pETGAF25 をそれぞれ構築し、これらのプラスミドを大腸菌 MM294 (DE3)/pLysS に導入した。得られた pETGAF1 を含む大腸菌株を培養し、破碎後、大腸菌粗抽出液の 20-70% 硫酸沈澱画分を DEAE-Toyopearl 650S にかけたところ、rhFGF-9 N3 はほとんどが素通り画分に存在した。この素通り画分をヘパリンカラムにかけたところ、rhFGF-9 N3 は 0.77M NaCl の位置に溶出された (Fig.6A)。このピーク画分を集めて精製標品とした。精製標品を銀染色したところ、rhFGF-9 N3 はほぼ単一にまで精製されていた。また、精製標品は、N 末端認識抗体を用いたウェスタンブロット解析で単一なバンドを示した (Fig.6B)。rhFGF-9 N33 の抽出、精製は rhFGF-9 N3 の場合と全く同じ方法を用い、銀染色 および C 末端認識抗体を用いたウェスタンブロット解析で単一のバンドを示すことを確認した。rhFGF-9 N3 はゲル上で分子量 27kDa の位置に、rhFGF-9 N33 は 22kDa の位置に泳動された。



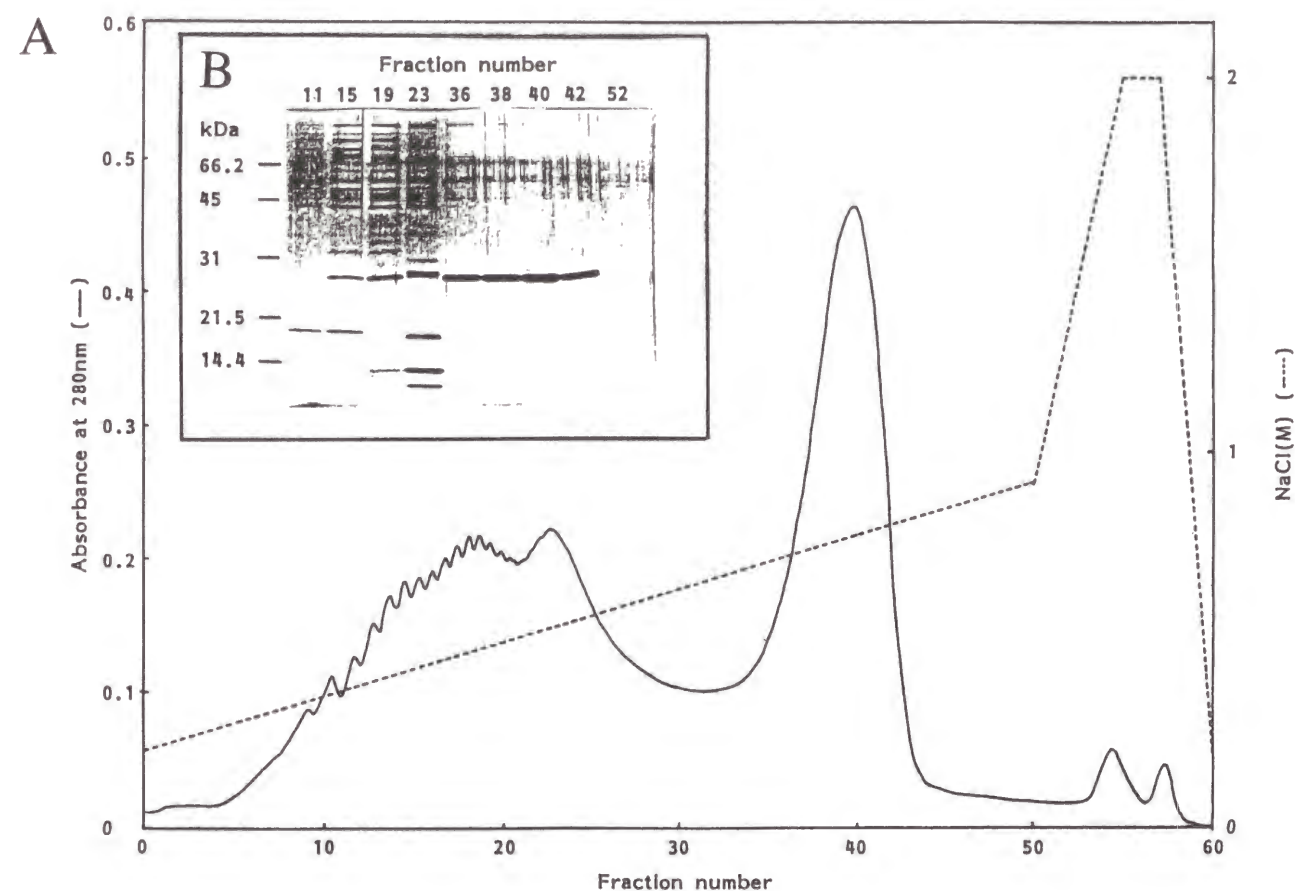


Fig. 6 Purification of FGF-9 N3 produced in E.coli. (A) Heparin HPLC of DEAE-toyopearl 650S eluate ; the final step of purification. DEAE-toyopearl 650S eluted fractions were applied to a heparin HPLC column, and proteins were eluted with the gradient of NaCl. The effluent was monitored for A280. The fractions were collected in tubes containing 20  $\mu$ l of 5% (wt/vol) CHAPS and 100  $\mu$ l of 0.5 M HEPES (pH 7.2). (B) Gel electrophoresis pattern of eluted fractions. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of each fraction (3  $\mu$ l) upon heparin HPLC was carried out 12.5% polyacrylamide gel under reducing conditions. Proteins were stained by silver-staining method. Lane M, low-molecular-size-maker proteins (Bio-Rad Laboratories)(bovine serum albumin, 66.2kDa ; ovalbumin, 45kDa ; carbonic anhydrase, 31kDa ; soybean trypsin inhibitor, 21.5kDa ; lysozyme, 14.4kDa ; 50 ng each).

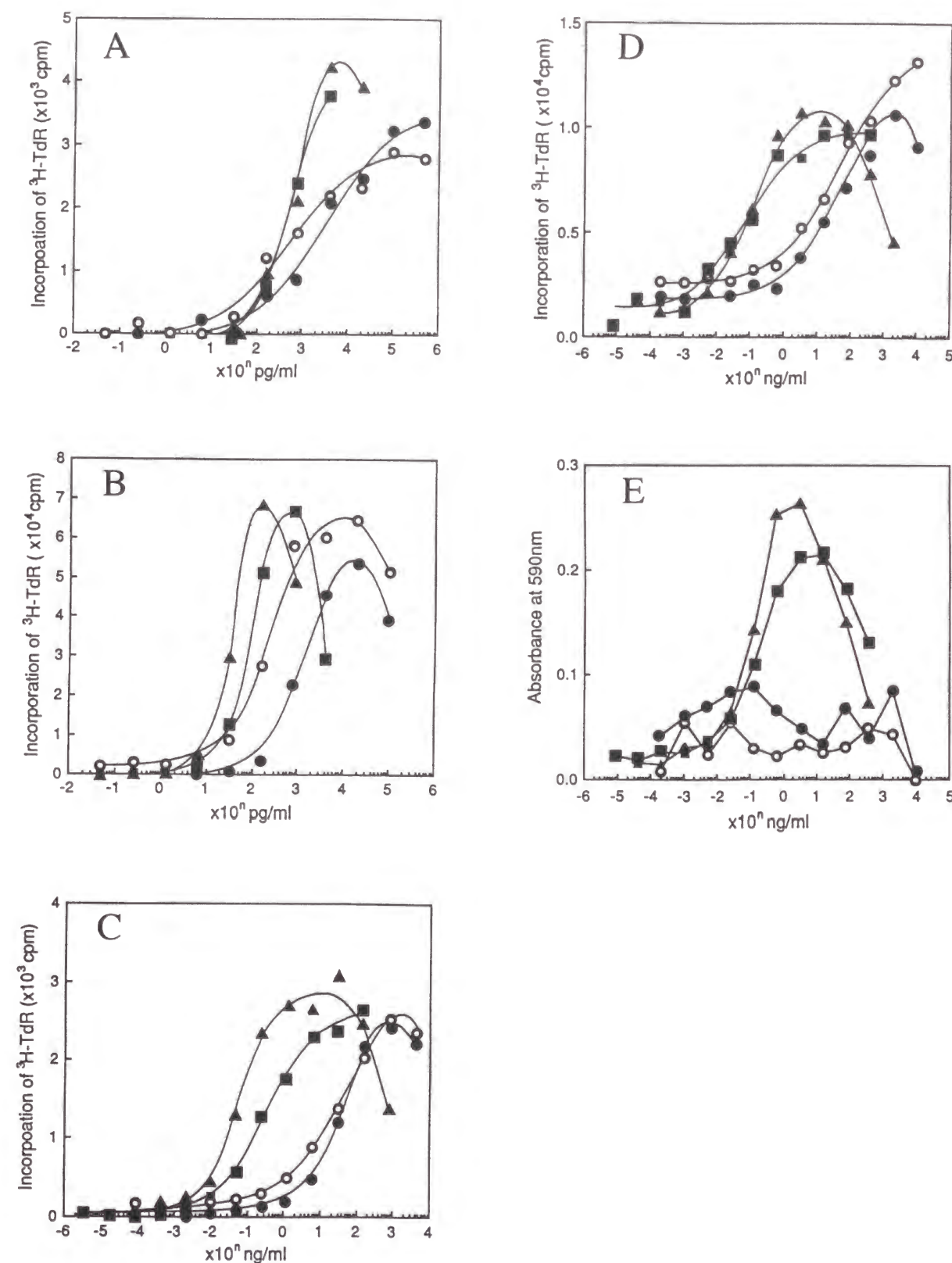


Fig. 7 Effect of FGFs on several types of cells. A, rat primary glial cells ; B, BALB/c 3T3 fibroblasts ; C, PC-12 ; D, rat smooth muscle cells ; and E, HUVE cells. ●, FGF-9 N3 ; ○, FGF-9 N33 ; ▲, FGF-1 ; and ■, FGF-2.

## 6) rFGF-9 の生物活性

精製された rhF GF-9 N3 および rhFGF-9 N33 を用いて種々の細胞株に対する FGF-9 の生物活性を検討し、rFGF-1 (57) あるいは rFGF-2 (58) の作用と比較した (Fig.7)。FGF-9 は、ラット初代培養グリア細胞、マウス BALB/c 線維芽細胞に対しては、0.1 ng/ml 以上の濃度で  $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みを促進させた（前者は 12.5 ng/ml、後者は 6.25 ng/ml 以上の濃度でプラトーに達した）。ラット副腎褐色細胞腫由来 PC-12 細胞株に対しては、0.6 ng/ml 以上の濃度で  $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みを促進させた（160ng/ml 以上の濃度でプラトーに達した）。ラット初代培養血管平滑筋細胞に対しては、0.4 ng/ml から 1.25  $\mu\text{g/ml}$  までの濃度範囲で濃度依存的に  $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みを促進させた。これらの活性はいずれも rhFGF-9 N33 の方が rhFGF-9 N3 よりも約 3 倍強かった。しかし、ヒトさい帯由来血管内皮細胞 (HUVE) に対しては、細胞増殖促進活性は認められなかった。

## 7) ラット FGF-9 cDNA のクローニングと構造解析

ヒト FGF-9 cDNA 断片を用いてラット脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、1つのポジティブクローン (R1) を得た。このクローンは全コード領域を含んでいなかった。そこで、3' 側特異的プライマーを用いて FGF-9 濃縮 cDNA ライブラリーを作製して再度スクリーニングを行った。その結果、全長を含むクローン (R6) を得た。cDNA の構造解析の結果、ラット FGF-9 はヒト FGF-9 と極めて高い相同性を有しており、塩基配列レベルでの相同性は 94% と非常に高いことが明らかになった。塩基配列から想定されるアミノ酸配列を比較すると、ラット FGF-9 はヒトと同じ 208 アミノ酸からなり、ヒトとの違いは 9 番目の Asp が Ser に変わっているだけであった。

## 3. 考察

新規増殖因子である GAF の N 末端アミノ酸配列をもとにしてオリゴヌクレオチドを合成し、PCR 法、ハイブリダイゼーション法を用いて GAF cDNA をクローニングした。NMC-G1 の培養上清から精製された GAF 蛋白には分子量の異なる 3 種類の分子種 (30kDa、29kDa、25kDa) が存在する (23)。これら 3 種類の蛋白の N 末端側アミノ酸配列がすべて得られた cDNA のコードする配列に含まれていたことから (23)、これら 3 種類の GAF 蛋白は 1 つの遺伝子から転写翻訳された後、分解されてできたものであることが示唆される。精製された 30kDa の分子量を持つ GAF は cDNA 上の配列では 4 番目の Leu より始まっており、その分子量は 23.1kDa と計算された。糖鎖の分子量を加えても精製標品の SDS-PAGE による見値 30kDa よりも小さいが、これは、GAF 蛋白の高次構造のために実際よりも泳動上遅い移動度を示したことによるものと考えられる。構造解析の結果、GAF は FGF ファミリーの新しいメンバーであることが示唆され、FGF-9 と命名した。現在までに 13 種類の FGF ファミリー (FGF-1 (2)、FGF-2 (3,4)、FGF-3 (5,6)、

FGF-4 (7-10)、FGF-5 (11)、FGF-6 (12,13)、FGF-7 (14,15)、FGF-8 (16)、FGF-10 (17,18)、FGF-11 (19,20)、FGF-12 (19-21)、FGF-13 (19-21)) が報告されている。FGF-9 は 208 アミノ酸からなるポリペプチドからなり、アミノ酸配列で他の FGF ファミリーメンバーと約 30% の相同性を有していた。また、メンバー間で保存されている 2 つの Cys 残基や他の保存されているアミノ酸配列が FGF-9 でもよく保存されていた。FGF-9 の N 末端には、疎水性のアミノ酸のクラスターからなる典型的なシグナル配列 (148) は見いだされなかった。この点で、FGF-9 は FGF-1 や FGF-2 (2-4) と似ていた。FGF-9 は NMC-G1 の培養上清から単離、精製され因子であることから分泌蛋白と考えられる。精製された 30kDa FGF-9 の N 末端は 4 番目のアミノ酸 Leu より始まっており (23)、通常 20 アミノ酸程度の長さが必要とされるシグナルペプチドは見あたらず、わずか 3 個のアミノ酸が分泌シグナルとして働くには短すぎると考えられる。FGF-9 の分泌機構については、第三編第二章で論述する。

FGF-9 はヒトグリオーマ由来の細胞株 NMC-G1 の培養上清から精製され、グリア細胞に対する増殖活性を示した (23)。FGF ファミリーメンバーはガン形成を促進する活性を持つことが報告されている。FGF-9 cDNA を BALB/c 3T3 細胞にトランスフェクションしたところ形質転換が起こったことから (55,145)、FGF-9 にもトランスフォーミング活性があることが示される（これについては、第三編第四章で論述する）。FGF-9 がグリア細胞をガン化させた可能性も考えられる。

CHO 細胞に FGF-9 を発現させた。得られた CDGAF4 細胞が産生する FGF-9 の 30kDa と 27kDa の蛋白の N 末端アミノ酸配列はともに Ala-Pro-Leu-Gly-Glu-Val-Gly- で、第 2 番目のアミノ酸である Ala から始まっていたことから、最初の Met 以外の N 末端アミノ酸は切断されずに細胞外に分泌されたと考えられる。3kDa の糖鎖を 1 本持っている天然の FGF-9 (23) と 30kDa の組換え FGF-9 は SDS-PAGE 上で同じ移動度を示し、30kDa の組換え FGF-9 を N-glycanase 処理したところ 27kDa 蛋白と同じ位置に泳動された。これらのことから、30kDa と 27kDa の蛋白の分子量の違いは糖鎖の付加の有無によるものであり、CHO 細胞から分泌された 30kDa の蛋白には天然の FGF-9 と同じ大きさの糖鎖 (3kDa) が付加していることが推察される (Fig.5)。なお、21kDa 蛋白は 33 番目の Leu から始まっており、FGF-9 が分泌された後に蛋白分解を受けて生じたものと思われる。

グリオーマ細胞 NMC-G1 の培養上清からは、30kDa と N 末端側が切断された 25kDa の分子種が得られている (23)。hFGF-9 の cDNA を大腸菌中で T7 プロモーターの支配下に発現させて得られた産物をヘパリンカラムを用いて精製し、取得した組換え型因子を用いて FGF-9 の物性および生物活性を検討した。rhFGF-9 N3 および rhFGF-9 N33 は、大腸菌破碎後の可溶画分に存在した。FGF-9 は分泌蛋白であるが、その N 末端側に疎水性アミノ酸のクラスターからなる典型的なシグナル配列が存在しなかった (Fig.3)。このことから、rhFGF-9 N3 および rhFGF-9 N33 は大腸菌の膜画分にトラップされることなく可溶化されたものと考えられる。精製過程での rhFGF-9 N3 および rhFGF-9 N33 の挙動から、菌体抽出液中の rhFGF-9 は核酸と結合して存在していることがわかった（データ不載）。このような性質は他の FGF ファミリーには報告されておらず、FGF-9 の特徴の一つであると思われる。精製された rhFGF-9 N3 はゲル上で分子量 27kDa の位置に、



rhFGF-9 N33 は 22kDa の位置に泳動された。いずれの分子量も 3 kDa の糖鎖が付加していないことから、グリオーマから精製された天然型因子の分子量 30kDa および 25kDa によく一致した。天然型因子は、25kDa 分子の比活性が 30kDa 分子の約1.5倍強かったが、組換え標品でも比活性は rhFGF-9 N33 の比活性が rhFGF-9 N3 の約 2 倍高かった。また、天然型因子と組換え標品は、糖鎖の有無にかかわらず活性はほぼ同等であった。

rhFGF-9 N3 および rhFGF-9 N33 は、ラット初代培養グリア細胞の増殖を促進するばかりではなく、マウス BALB/c 繊維芽細胞、ラット副腎褐色細胞腫由来 PC-12 細胞株およびラット初代培養平滑筋細胞の増殖を促進させた。これらの活性は rhFGF-9 N33 の方が rhFGF-9 N3 よりも強かった。このことから、FGF-9 の N 末端 33 アミノ酸配列中には活性部位は存在しないこと、むしろ N 末端側が活性を阻害している可能性も考えられる。また、FGF-9 はヒトさい帯由来血管内皮細胞の増殖を促進させなかった。これらの諸性質は天然の FGF-9 (23) と同じで、FGF-1 あるいは FGF-2 とは異なった作用スペクトラムを示した。さらに、PC-12 細胞に対しては神経突起を伸展させる作用が、ラット神経細胞に対しては生存延長作用が認められた。FGF-9 はグリア細胞の増殖だけでなく、神経系の細胞に広く作用し、増殖だけでなく分化作用も有している可能性が示唆される。しかし、これらの作用は FGF-2 に比べて非常に弱く、かなりの高濃度を用いた場合に作用したことから、FGF-9 が本来持つ生理作用ではないことも考えられる。FGF ファミリーは広範な作用を持つことが知られており、FGF-9 も生体内で広範な生理作用を持つことが考えられる。

ヒト末梢血リンパ球より得た染色体 DNA を制限酵素で切断し、サザンブロット解析を行った。その結果、FGF-9 cDNA とハイブリダイズするバンドは 1 本ないしは 2 本で、FGF-9 遺伝子は染色体上に 1 コピーしか存在しないことが示された (データ不載)。

FGF-2 のアミノ酸配列はヒトとラットで近似しており、種間でアミノ酸配列が高度に保存されていることが示されている (4)。FGF-9 のアミノ酸配列もヒトとラットで近似していた。また、ヒト FGF-9 とマウス FGF-9 は塩基配列レベルでは 92%、アミノ酸配列レベルでは 99% の相同性があることが報告された (145)。これらの結果から、FGF-9 は塩基配列レベル および アミノ酸配列レベルで種間で高度に保存されていることが示唆される。このように、種間で FGF-9 アミノ酸配列が高度に保存されていることから、本因子が生体内で重要な役割を担っていることが示唆される。

## 第一編 小 括

1. 精製された 3 種類の GAF 蛋白質の N 末端アミノ酸配列をもとに GAF をコードする cDNA をクローン化し、GAF の全構造を明らかにした。得られた cDNA は 1493bp からなり、208 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。

2. 得られたアミノ酸配列の相同性の検索から、GAF は FGF ファミリーに属することが示され、9 番目の新しいファミリーメンバーとして FGF-9 と命名した。

3. 得られた cDNA を用いて COS 細胞および大腸菌で組換え型 FGF-9 (rhFGF-9) を生産、精製した。大腸菌で産生させた rhFGF-9 が、グリア細胞培養上清より得られた天然型 FGF-9 と同等の増殖促進活性を有することを確認した。

4. ラット FGF-9 cDNA をラット脳 cDNA ライブラリー から クローン化して、構造解析を行った。ラット FGF-9 はヒト FGF-9 に極めて高い相同性を示した。

## 第二編 ヒト FGF-9 に対するモノクローナル抗体の作製 と FGF-9 測定用高感度 EIA 系の構築

FGF-9 の生物学的な役割を解明していく上で、中和活性を有するモノクローナル抗体は有力な手段となる。FGF-9 は、ラット初代培養グリア細胞、マウス BALB/c 繊維芽細胞、ラット副腎褐色細胞腫由来 PC-12 細胞株 および ラット初代培養平滑筋細胞の増殖を促進させ、これらの活性は rhFGF-9 N33 が rhFGF-9 N3 よりも強かったことから、FGF-9 の活性部位は N 末端 33 アミノ酸配列中には存在しないことが考えられた（第一編）。そこで著者らは、FGF-9 と rhFGF-9 N33 の両者を認識しうる中和活性を持つモノクローナル抗体を得るために、組換えヒト FGF-9 N33（rhFGF-9 N33）を免疫原として、ヒト FGF-9 に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。さらに、得られたモノクローナル抗体を用いて FGF-9 に対する高感度 EIA 系を構築した。これらの成績について以下に論述する。

### 1. 実験材料と方法

#### 1) 免疫法

定法に従って免疫を行った (59)。BALB/c マウス（雌、8週令、SLC）にフロイント完全アジュバント (Difco) に  $10\mu\text{g}$  の rhFGF-9 N33 を懸濁したものを皮下接種した。以後 3 週間間隔で 3 回 フロイント不完全アジュバント (Difco) に  $10\mu\text{g}$  の rhFGF-9 N33 を懸濁したものを皮下接種した。さらに 3 週間後、 $10\mu\text{g}$  の rhFGF-9 N33 を尾静脈より注射した。

#### 2) 細胞融合とモノクローナル抗体の作製

最終免疫の 3 日後に免疫したマウスから脾臓を摘出した。脾臓細胞は IH 培地（Iscove 培地と Ham F-12 培地を 1 : 1 に混合した培地、Flow）に浮遊させ、45% ポリエチレングリコール 6000 を用いて、マウス ミエローマ細胞 P3U1 と融合させた (60)。融合比は、脾細胞 5 に対してミエローマ細胞 1 の割合とした。融合後、96穴細胞培養用プレート (NUNC、Denmark) に脾細胞  $5 \times 10^5$  cells/well の濃度で播種し、20% FCS を含む IH 培地で 24 時間培養した。その後、HAT 培地（0.1mM ヒポキサンチン、 $0.4\mu\text{M}$  アミノプテリン、 $16\mu\text{M}$  チミジン、20% FCS を含む IH 培地、Boehringer Mannheim）に交換した。増殖してきたハイブリドーマの培養上清を下記の ELISA 法によって調べ、FGF-9 に対する抗体産生ハイブリドーマを選出した。得られた抗体産生ハイブリドーマは、限



界希釈法によりクローニングした。

クローニングされたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、10% FCS を含む IH 培地で培養した。8～10週令の BALB/c マウス（雌）に、ミネラルオイル (Aldrich) 0.5ml を腹腔内注射し、2週間後  $1 \times 10^7$  個のハイブリドーマを腹腔内に注射した。1～2週間後にこれらのマウスより腹水を採取し、細胞および脂肪等を除去した後、HPLC プロテインGカラムクロマトグラフィー (Pharmacia LKB Biotechnology) により抗体を精製した (61)。

### 3) ELISA 法

0.05M 炭酸-重炭酸緩衝液 (pH9.6) を用いて  $10 \mu\text{g/ml}$  に調製した rhFGF-9 N33 溶液を、96穴イムノプレート (NUNC) に  $100 \mu\text{l/well}$  ずつ分注して、 $4^\circ\text{C}$  で一晩吸着させた。rhFGF-9 N33 を除去後、PBS で洗浄し、25% Block-Ace（大日本製薬）および 0.01% チメロザール (Sigma) を含む PBS (Flow) を  $200 \mu\text{l/well}$  加えて  $4^\circ\text{C}$  で一晩放置した。この溶液を除去後、PBS で洗浄し、ハイブリドーマ培養上清を  $100 \mu\text{l/well}$  加えて室温で2時間反応させた。プレートを 0.05% Tween 20 (Bio-Rad) を含む PBS (TPBS) で洗浄後、2次抗体として HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Cappel) を 10% Block-Ace を含む PBS で 1/1000 に希釈したものを  $100 \mu\text{l/well}$  加え、室温で2時間反応させた。再び TPBS で洗浄して未結合の2次抗体を除去した後、ペルオキシダーゼ基質 (Sigma) を加えて室温で20～40分間発色させ、490nm の吸光度を測定した (60)。

### 4) ウェスタンブロット解析

第一編 1-5) に記載した方法で実施した。それぞれ 100ng の rhFGF-9 N3、rhFGF-9、rhFGF-1 および rhFGF-2 を 15% ポリアクリルアミドゲルにアプライして、SDS-PAGE を行った。転写された蛋白は、2000倍に希釈したモノクローナル抗体、次いで 1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Promega) と反応させた後、免疫複合体を ProtBrot Western Blot AP Starter System にて検出した。

### 5) 抗 FGF-9 モノクローナル抗体の中和活性の検討

抗体の中和活性は、FGF-9 によるマウス BALB/c 3T3 A31-1-1 繊維芽細胞の DNA 合成促進作用に対する抑制を  $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みを指標として測定した (62)。0.5% FCS を含む DMEM (Flow) に浮遊させた  $2 \times 10^3$  個の A31 細胞を 96穴マイクロプレートに播種して3日間培養した。ここに rhFGF-9 N3 あるいは rhFGF-9 N33 と種々の濃度に希釈したモノクローナル抗体を添加して一晩培養した。ヘパリンの影響を検討する実験では、ここに  $20 \mu\text{g/ml}$  のヘパリンを添加した。各穴に 37kBq の  $^3\text{H}$ -チミジン (Amersham) を添加して5～7時間培養した後、各穴を PBS で洗浄した。さらに、 $100 \mu\text{l/well}$  の 5% SDS 溶液を添加して  $37^\circ\text{C}$  で一晩放置した。各穴の細胞抽出液を集め、細胞に取り込まれた  $^3\text{H}$ -チミジンの量をシンチレーションカウンターで測定した。

### 6) サンドウィッチ EIA 法

精製した MoAb 13-3 ( $10 \mu\text{g/ml}$ )  $100 \mu\text{l/well}$  をイムノプレートに加え、 $4^\circ\text{C}$  で一晩吸着させた。PBS で洗浄後、25% Block-Ace および 0.01% チメロザールを含む PBS を  $200 \mu\text{l/well}$  加え、 $4^\circ\text{C}$  で一晩ブロックングを行った。PBS で洗浄し、10% Block-Ace を含む PBS で希釈したサンプルあるいは rhFGF-9 N33 を  $100 \mu\text{l/well}$  加えて室温で2時間反応させた。ヘパリンの影響を検討する実験では、1～ $100 \mu\text{g/ml}$  のヘパリンおよび 10% Block-Ace を含む PBS で rhFGF-9 N33 を希釈した。プレートを TPBS で洗浄後、2次抗体として HRP 標識 MoAb 150-59 を 10% Block-Ace を含む PBS で 1/3000 に希釈したものを  $100 \mu\text{l/well}$  加え、室温で2時間吸着させた。再び TPBS で洗浄して未結合の2次抗体を除去した後、ペルオキシダーゼ基質 (Sigma) を加えて室温で20～40分間発色させ、490nm の吸光度を測定した (60)。

### 7) 使用細胞の供給源

ヒトアストロサイトーマ (grade III) から確立されたヒトグリオーマ細胞株 NMC-G1 細胞は、近藤達也博士（国立医療センター）より供与を受けた。他のヒト細胞株は、American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。ヒトグリオーマ細胞株 NMC-G1、ヒト胃ガン細胞株 AZ-521、ヒト肺ガン細胞株 A549 は 10% FCS を含む DMEM 培地にて培養した。ヒト細胞株 Hela-S3、ヒト結腸ガン細胞株 WiDr、ヒト肺ガン細胞株 CADO-LC3 および CaLu-1、ヒト白血病細胞株 J-111、ヒトザルコーマ細胞株 HOS および MG-63、ヒトメラノーマ細胞株 G-361、ヒトグリオブラストーマ T98G、ヒトepithelial-like amnion WISH は、10% FCS を含む MEM 培地 (Flow) で培養した。ヒトpleural effusion leukemia U937、ヒトバーキットリンフォーマ RPMI-1778 および NC-37 は、10% FCS を含む RPMI1640 培地 (Flow) で培養した。

### 8) 細胞培養上清の調製

ヒトグリオーマ細胞株 NMC-G1 は、10% FCS を含む DMEM 培地 (Flow) で単層にいたるまで培養した後、2% FCS を含む DMEM 培地に交換して3日間培養した。その他の細胞は、10% FCS を含む DMEM 培地あるいは RPMI1640 培地で3日間培養後、それぞれ無血清培地に交換してさらに1日培養した。これらの細胞の培養上清は、限外濾過膜 (Centriprep-10、amicon) で10倍に濃縮した。

## 2. 実験成績

### 1) FGF-9 に対するモノクローナル抗体の作製

FGF-9 に対する抗体を産生するハイブリドーマを取得するために、FGF-9 のN末端側の33アミノ酸を欠失した rhFGF-9 N33 をマウスに免疫して、その脾臓細胞を P3U1 細胞と融合した。ハイブリドーマ培養上清中に分泌される特異的抗体は ELISA 法によって確認した。その結果、ヒト FGF-9 に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを4株取得し、精製したモノクローナル抗体をそれぞれ、150-59、13-3、40-20、4-82 と命名した。抗体のサブクラスは、MoAb 150-59 と MoAb 40-20 が IgG1、MoAb 13-3 が IgG2b、MoAb 4-82 は IgM であった。FGF-1 あるいは FGF-2 との交差反応性をウェスタンブロット法により検討した。MoAb 13-3 および MoAb 40-20 は rhFGF-1 と結合しなかったが、FGF-2 とはわずかに反応した (Fig.8)。

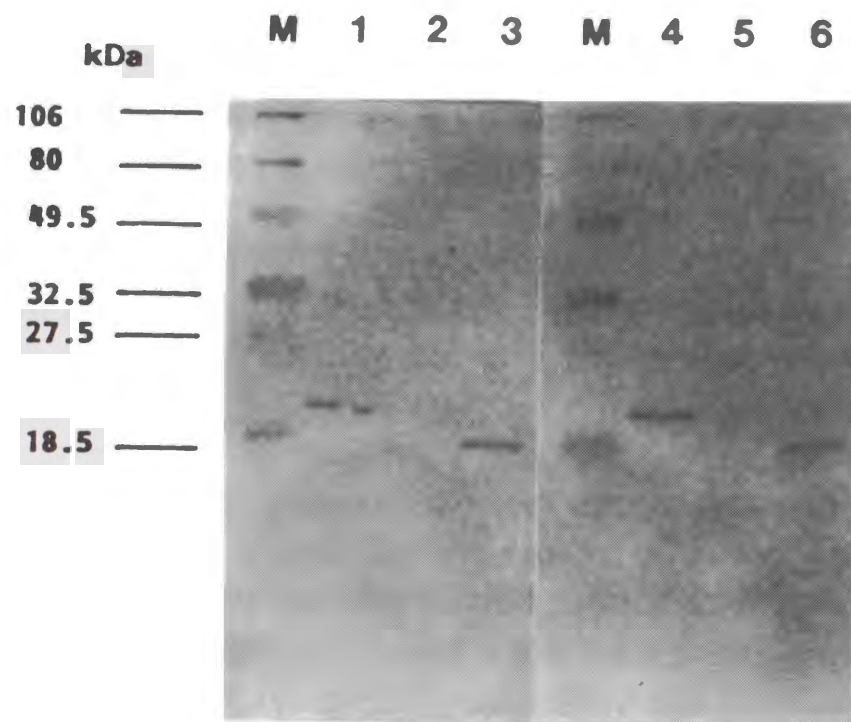


Fig. 8 Cross-reactivity of antibodies against rhFGF-1 and rhFGF-2. SDS-PAGE of rhFGF-9 N33, rhFGF-1, or rhFGF-2 (100 ng each) was carried out with 15% polyacrylamide gel under reducing conditions. These proteins were reacted with MAbs after transfer to a nitrocellulose membrane. Lanes 1 and 4, rhFGF-9 N33; lanes 2 and 5, rhFGF-1; lanes 3 and 6, rhFGF-2; Lanes 1, 2, and 3, MAb 13-3; lanes 4, 5, and 6, MAb 40-20; lane M, molecular marker (50 ng each).

### 2) モノクローナル抗体の中和活性

得られたモノクローナル抗体の FGF-9 に対する中和活性を検討した。MoAb150-59 は、rhFGF-9 N33 によって惹起される BALB/c 3T3 細胞増殖促進活性を用量依存的に阻害した (Fig.9A)。他の3種のモノクローナル抗体にはこのような阻害活性は認められなかった。MoAb150-59 は rhFGF-9 N3 による BALB/c 3T3 細胞増殖反応も同等に阻害し、MoAb150-59 は FGF-9 に対する中和抗体であることが明らかになった。MoAb150-59 は FGF-9 の活性をほぼ等モルで抑制した。さらに、MoAb 150-59 の FGF-1、FGF-2 および FGF-4 に対する交差反応性を検討した (Fig.9B)。MoAb 150-59 は rhFGF-9 N3 および rhFGF-9 N33 によって惹起される BALB/c 3T3 細胞増殖促進を用量依存的に阻害したが、FGF-1、FGF-2 および FGF-4 によって惹起される BALB/c 3T3 細胞増殖促進は阻害しなかった (Fig.9B)。ヘパリンは、MoAb150-59 の中和活性にはほとんど影響を与えなかった (Fig.10)。

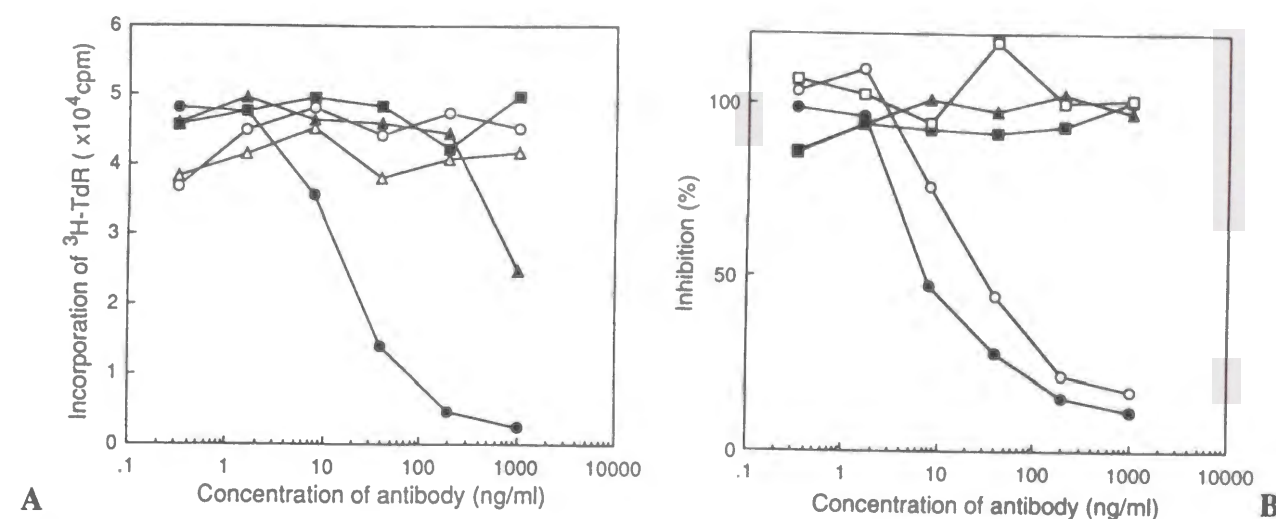


Fig. 9 Neutralizing activity of MAbs against FGFs. (A) RhFGF-9 N33 (2 ng/ml) was added to the culture with MAb 150-59 (closed circles), MAb 13-3 (solid triangles), MAb 40-20 (solid squares), MAb 4-82 (open triangles), or normal mouse IgG (open circles), and the mitogenic effects were measured by [ $^3$ H]thymidine incorporation. MAb 150-59 neutralized the mitogenic effects of rhFGF-9 N33. (B) RhFGF-9 N33 (2 ng/ml, solid circles), rhFGF-9 N3 (2 ng/ml, open circles), rhFGF-1 (1 ng/ml, solid triangles), rhFGF-2 (0.1 ng/ml, solid squares), or FGF-4 (0.2 ng/ml, open squares) was added to the culture with MAb 150-59 and the mitogenic effects were measured. Data are averages of three experiments. MAb 150-59 did not neutralize the growth stimulation caused by rhFGF-1, rhFGF-2, and FGF-4.



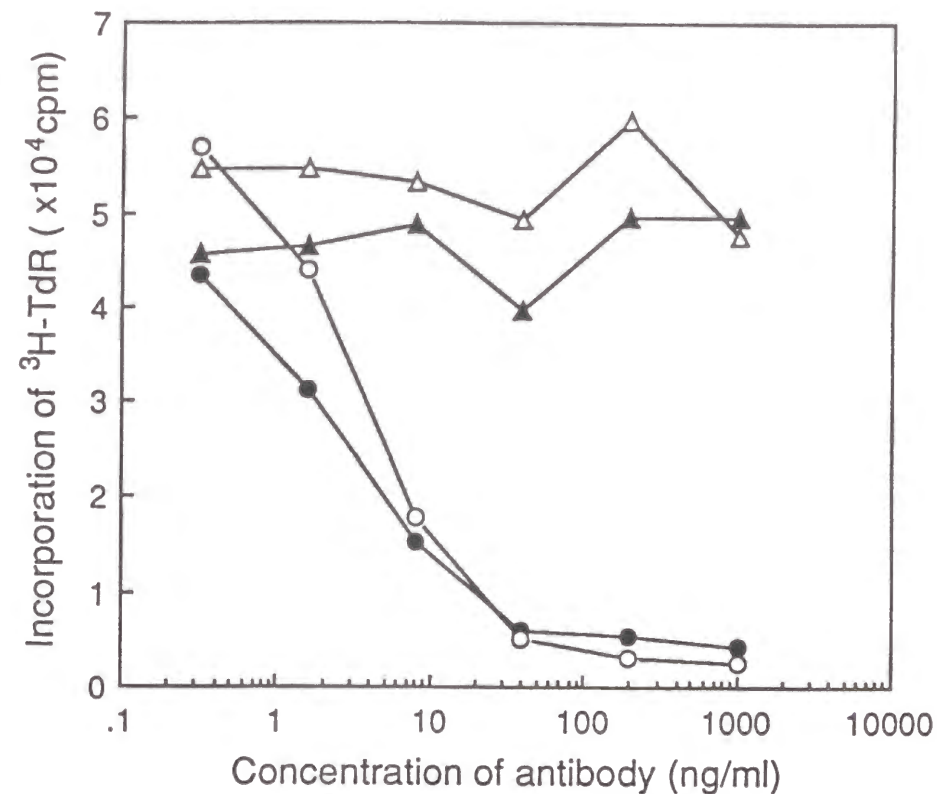


Fig. 10 Effect of the neutralizing activity of MoAb 150-59 against FGF-9 N33. RhFGF-9 N33 (2ng/ml) was added to the culture with MoAb 150-59 (●), MoAb 150-59 with 20ug/ml heparin (○), normal mouse IgG (▲), or normal mouse IgG with 20ug/ml heparin (△), and the mitogenic effects were measured by  $[^3\text{H}]$ -thymidine incorporation. Heparin did not effect on the neutralizing activity of MoAb 150-59.

### 3) FGF-9 に対する高感度 EIA 系の構築

FGF-9 を高感度に検出する EIA 系の構築を行った。先に得られた MoAb13-3、MoAb 40-20 および MoAb 150-59 の 3 種類の抗体を種々組み合わせた EIA 系を構築して、それぞれの感度を検討した。その結果、固相抗体として MoAb13-3 を、HRP 標識抗体として MoAb150-59 を用いることによって最も高感度に FGF-9 を検出できることが明らかとなった。rhFGF-9 N33 を用いて検討した時、検出限界は 30pg/ml (3pg/well) であった (Fig.11)。データには示さなかったが、この EIA 系では rhFGF-9 N3 も同等の感度で検出することができた。FGF-9 は他の FGF ファミリーメンバーと高いホモロジーを示すことから (63)、この EIA 系に於ける他の FGF ファミリーとの交差反応性を検討した。本 EIA 系は、10  $\mu\text{g/ml}$  までの rhFGF-1 および rhFGF-2 とは反応しなかった (Fig.12)。また、ヘパリンは本 EIA 系の検出感度には影響を及ぼさなかった (Fig.13)。

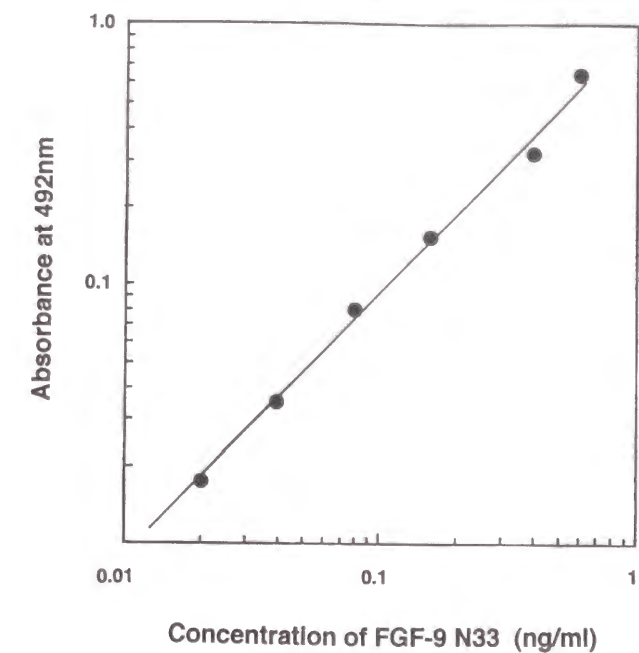


Fig. 11 Typical standard curves of the sandwich EIA for FGF-9. Serially diluted rhFGF-9 N33 solution was measured by sandwich EIA.

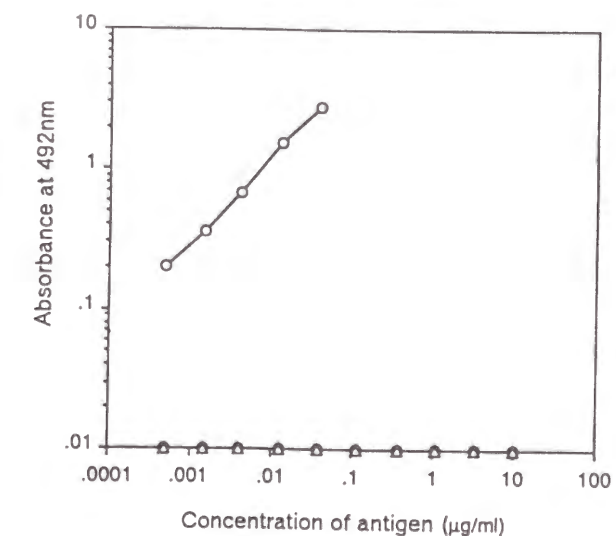


Fig. 12 Specificity of the sandwich EIA. Serially diluted rhFGF-9 N33 (open circles), rhFGF-1 (closed circles), or rhFGF-2 (open triangles) solution was assayed by the sandwich EIA for FGF-9. FGF-1 and FGF-2 were not detected up to 10  $\mu\text{g/ml}$ .

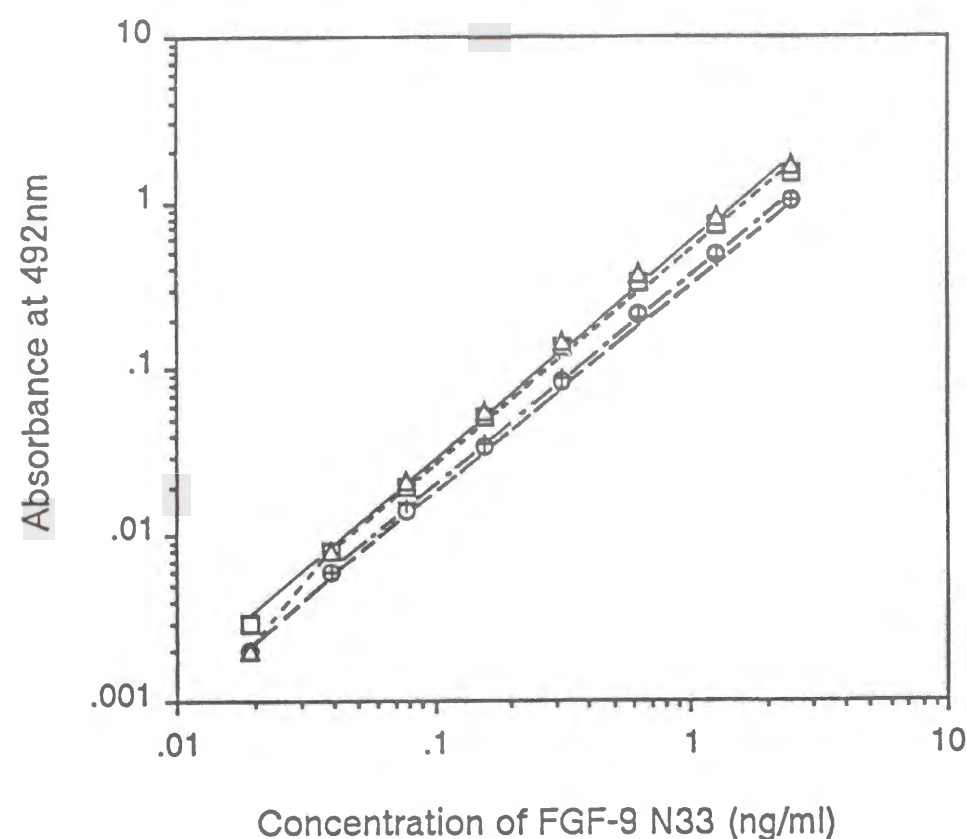


Fig.13 Effect of the heparin on the sandwich EIA for FGF-9. Serially diluted rhFGF-9 N33 solutions with 1ug/ml heparin (+), 10ug/ml heparin (□), 100ug/ml heparin (△) or none (○) were measured by sandwich EIA for FGF-9. Heparin did not effect on the sensitivity of this sandwich EIA.

#### 4) ヒト ガン細胞株からの FGF-9 の分泌

種々の ヒト ガン細胞株からの FGF-9 の分泌を、構築した EIA 系を用いて検討した (Table 1)。FGF-9 の精製に用いた細胞株 ヒト グリオーマ細胞株 NMC-G1 (23) と、ヒト 胃ガン細胞株 AZ-521 細胞の培養上清中に高濃度の FGF-9 が検出された (それぞれ、460 pg/ml および 740pg/ml)。FGF-9 は、Table 1 に記載した他の細胞株の培養上清中には検出できなかった (<30pg/ml)。

Table 1 IMMUNOREACTIVE FGF-9 IN VARIOUS CELL CONDITIONED MEDIUM

Tumor/tissue/site	Name	FGF-9 <sup>a</sup> (pg/ml)
Carcinoma		
Cervix	Hela-S3	— <sup>b</sup>
Colon	WiDR	—
Lung	CADO-LC3	—
	Calu-1	—
	A549	—
Stomach	AZ-521	740
	NUGC-3	—
	NUGC-4	—
Leukemia and lymphoma		
Pleural effusion	U937	—
Bone marrow	IM-9	—
	MEG-O1	—
Blood	J-111	—
Burkitt lymphoma	Namalwa	—
	Raji	—
Sarcoma	Ret-2	—
	HOS	—
	MG-63	—
Melanoma	G-361	—
Glioblastoma	NMC-G1	460
	T98G	—
Lymphoblast	RPMI-1778	—
	NC-37	—
Epithelial-like, amnion	WISH	—

<sup>a</sup>Each cell's conditioned medium was concentrated 10 times and assayed in the sandwich EIA for FGF-9. Values represent FGF-9 concentration in original conditioned medium.

<sup>b</sup>Not detected (<30 pg/ml).



### 3. 考察

rhFGF-9 N33 を免疫原として、FGF-9 に対するモノクローナル抗体を産生する 4 種類のハイブリドーマを取得した。これらが分泌するモノクローナル抗体はいずれも、ELISA 法において rhFGF-9 N33 と rhFGF-9 N3 の両方を認識した。ウェスタンブロット法では、MoAb150-59 は FGF-9 にわずかにしか反応しなかった。ウェスタンブロット法では、SDS によって抗体は変性した蛋白を認識することから、MoAb150-59 は FGF-9 の 3 次元構造を認識していることも考えられる。MoAb13-3 および MoAb 40-20 は FGF-1 とは交差反応性を示さなかったが、FGF-2 とはわずかに反応した。これらの抗体が、FGF-9 と FGF-2 との共通の配列を認識していることが示唆される。

取得した 4 種類のモノクローナル抗体のうち、MoAb 150-59 は FGF-9 に対する中和活性を示した。MoAb150-59 は FGF-9 による線維芽細胞の増殖促進活性をほぼ等モルで抑制したことから、このモノクローナル抗体の FGF-9 に対する親和性は FGF-9 とそのレセプターとの結合親和性よりも強いことが考えられる。また、FGF-1、FGF-2、および FGF-4 による線維芽細胞の増殖促進活性を MoAb150-59 は抑制することができなかったことから、MoAb150-59 はこれらの FGF の活性部位とは別の部位の構造を認識していることが考えられる。

取得した 4 種類のモノクローナル抗体のうち MoAb150-59 と MoAb13-3 とを用いて、FGF-9 に対する高感度 EIA 系を構築した。FGF-9 は他の FGF と高い相同性を示す (第一編、63) ことから、構築した EIA 系において他の FGF に対する交差反応性を調べておく必要がある。MoAb13-3 はウェスタンブロット法では FGF-2 とわずかに交差反応性を示したが、本 EIA 系では  $10\mu\text{g/ml}$  までの rhFGF-1 および rhFGF-2 とは全く交差反応を示さなかった。FGF-9 は生体内や各種臓器の組織中に広く存在するヘパリンやヘパラン硫酸と強く結合することが報告されている (23)。本 EIA 系に用いたモノクローナル抗体の FGF-9 認識部位が、FGF-9 とヘパリンとの結合部位と同じか、あるいはそれに非常に近い場合、ヘパリンは本 EIA 系の競合阻害薬となりうる。一方、ヘパリンは FGF-2 に対する EIA 系ではその感度を上昇させるとの報告もある (64)。ヘパリンはこの系の感度には全く影響を与えなかった。ヘパリンは FGF-9 に結合するが、そのコンフォメーションには影響を与えないのかもしれない。本 EIA 系を用いて rhFGF-9 N33 投与マウスの血中の rhFGF-9 N33 を測定することによって、FGF-9 の血中動態を観察することができた (データ不載)。本 EIA 系は生体内試料中の FGF-9 の定量にも有効であることが示された。

種々のガン細胞株の培養上清の FGF-9 活性を測定したところ、ヒトグリオーマ細胞株 NMC-G1 とヒト胃ガン細胞株 AZ-521 の培養上清に FGF-9 が検出された。これらの細胞のガン化に FGF-9 が関与している可能性も考えられる。これについては、第三編第四章で考察する。

## 第二編 小括

1. rhFGF-9 N33 を免疫原としてヒト FGF-9 に対するモノクローナル抗体を 4 種類作製した。

2. 得られたモノクローナル抗体のうち MoAb 150-59 は、FGF-9 によるマウス線維芽細胞増殖促進活性に対する中和活性を有していた。

3. 得られたモノクローナル抗体のうち MoAb13-3 を固相抗体として、MoAb150-59 を標識抗体として用いて、FGF-9 に対する高感度 EIA 系を構築した (検出限界  $3\text{pg/well}$ )。

4. 本 EIA 系を用い、FGF-9 の精製に用いたヒトグリオーマ細胞株 NMC-G1 の培養上清中に高濃度の FGF-9 が分泌されていることを確認した。また、ヒト胃ガン細胞株 AZ-521 が培養上清中に FGF-9 を分泌していることが明らかとなった。

### 第三編 FGF-9 の性状 および 生物活性

FGF ファミリーは互いにアミノ酸配列上で高い相同性を示す一群の因子である (2-21)。FGF ファミリーは、ヘパリンに結合する・線維芽細胞に対して増殖促進活性を有する・ガン原性を有するなどの共通した性質を有する。一方で、それぞれの因子に特徴的な性質も合わせ持っている。第三編では、FGF ファミリーにおける FGF-9 の特徴を明らかにするために、1) 成熟ラットでの FGF-9 発現部位、2) 分泌機構、3) 血小板産生促進作用、4) ガン原性、について検討を加えた。以下、四章に分けて論述する。

## 第一章 FGF-9 発現部位

FGF ファミリーの中でも、FGF-1と FGF-2 は種々の組織に存在している (134)。これに対して、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6 はオンコジーンの産物として同定され、主に胎生期やガン細胞に発現されている (135-138)。FGF-7 は腎臓、結腸、回腸に発現が認められていると報告されている (139)。脳では、FGF-1、FGF-2、FGF-5、FGF-10 の mRNA の発現が認められている (17,73)。

FGF-9 は ヒト グリオーマ細胞株 NMC-G1 の培養上清から精製された (23)。本章では、成熟ラットを用いて FGF-9 が実際に生体内で脳に発現しているのかどうか、また、他の部位での発現が認められるかどうかを mRNA ならびに蛋白レベルで検討した。

### 1. 実験材料と方法

#### 1) ノザンブロッティング法

RNA extraction kit (Pharmacia) を用いて、SD ラット(Charles River) の各臓器から RNA を精製し、oligo dT column (Pharmacia) にかけて Poly A<sup>+</sup> RNA を得た。得られた Poly A<sup>+</sup> RNA 10-20  $\mu$ g を 1 % アガロースゲル (1.1M formaldehyde、10mM リン酸緩衝液 (pH7.2)) で電気泳動した後、2x SSC 溶液でナイロンメンブレン (Biodyne) にブロッティングした。ハイブリダイゼーションは、0.1% SDS、170  $\mu$ g/ml 熱変性 サケ精子 DNA、プローブ (FGF-9 cDNA の全長、 $2 \times 10^9$  cpm/g、 $5 \times 10^6$  cpm/ml) を含む 6 x SSPE (1 x SSPE : 0.15M NaCl、10mM Na phosphate buffer、1 mM EDTA pH7.7)、5 x Denhardt's 溶液を用い 65°C で一晩行い、0.2 x SSC、0.1% SDS 溶液で 65°C 30分洗浄した。オートラジオグラムは、X-A R フィルム (Kodak) (Fig.14A) と イメージアナライザ (bio-image analyzer BAS2000、Fuji) (Fig.14B) を用いて作製した。

#### 2) ラット臓器中の FGF-9 の分布測定

9 週令の SD ラット (Charles River) の大脳、小脳、肝臓、肺、心臓、腎臓、脾臓、胃、胸腺、膵臓、小腸、大腸を摘出した。それぞれの臓器は、20mM Tris-HCl、0.15M NaCl (pH7.6) 溶液を氷冷下で 10ml/g となるように添加してポッターホモゲナイザーでホモゲナイズした。4 °C で 15000 rpm 3 分間 遠心した上清を、さらに 4000 rpm で 60 分間 遠心 (L8-70 SW55T1、Beckman) した上清をサンプルとして、第二編で構築した FGF-9 測定 EIA 系により FGF-9 を定量した (123)。

## 2. 実験成績

### 1) FGF-9 mRNA の検出

ヒト NMC-G1 から精製した poly A<sup>+</sup> RNA を用いて、ノザンブロット解析を行った結果、4.3kb のメジャーバンドと 3.4kb のマイナーバンドが検出された (Fig.14A)。

生体内での FGF-9 の転写状況を検討するため、成熟ラット臓器から poly A<sup>+</sup> RNA を調製し、ラット cDNA を用いてノザンブロット解析を行った。2.4kb のメジャーバンドと 3.8kb のマイナーバンドが腎臓と脳で検出された。腎臓に比べると、脳での FGF-9 mRNA の発現レベルは非常に低かった。肝臓、肺、脾臓、胸腺、精巣、心臓、副腎では FGF-9 mRNA は検出されなかった (Fig.14B)。

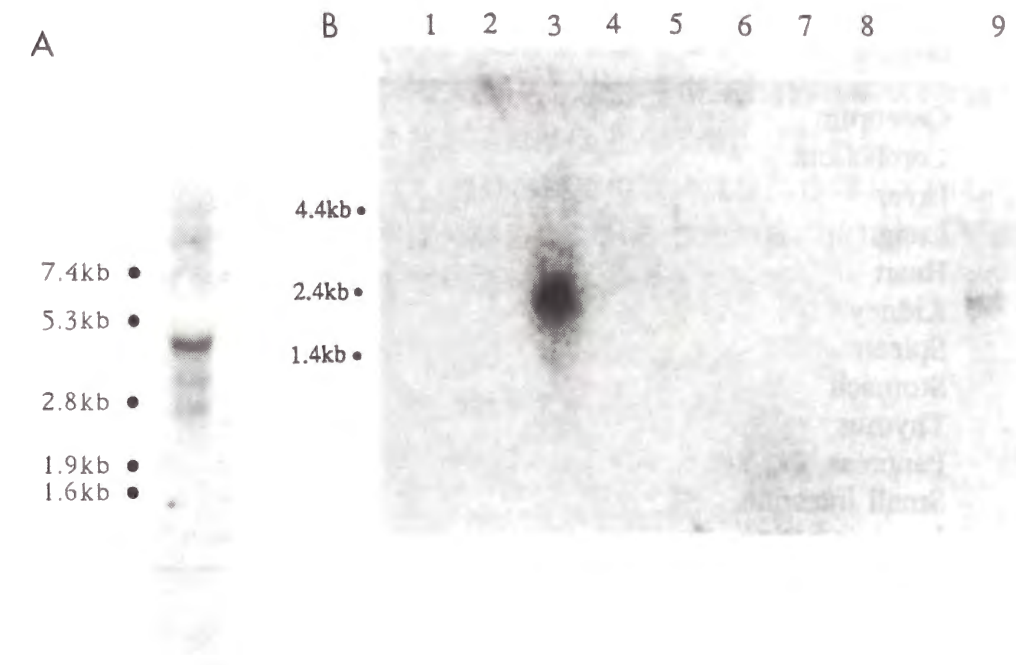


Fig. 14 Analysis of FGF-9 mRNA in a human glioma cell line and rat tissues. FGF-9 transcripts were detected by Northern blot analysis. Poly(A)<sup>+</sup> RNAs were prepared from human glioma cell line NMC-G1(A) and rat tissues (B). mRNAs (20  $\mu$ g of NMC-G1 mRNA and 10  $\mu$ g of rat tissue mRNAs) were size fractionated and blotted onto a nylon membrane. Tissues used (lanes): 1, liver; 2, lung; 3, kidney; 4, spleen; 5, thymus; 6, testis; 7, heart; 8, adrenal gland; 9, brain.



## 2) ラットにおける FGF-9 の臓器分布

ラットとヒトの FGF-9 のアミノ酸配列は互いに相同性が高く、N末端9番目のアミノ酸が異なるだけであり、この部分は rhFGF-9 N33 には含まれない(63)。従って、rh FGF-9 N33 を免疫原として作成したモノクローナル抗体を用いて構築された第二編で構築した EIA 系は、ラット FGF-9 も認識すると考えられる。そこで、本 EIA 系 (123) を用いて、FGF-9 の臓器分布を調べた。成熟ラットの脳、小脳、肝臓、肺、心臓、腎臓、脾臓、胃、胸腺、膵臓、小腸 および 大腸の抽出液中の FGF-9 を測定したところ、小脳にのみ検出され、1 g の組織あたり 1.52ng の FGF-9 と算出された (Table 2)。

Table 2 IMMUNOREACTIVE FGF-9 IN RAT ORGANS

Organs	FGF-9 <sup>a</sup> (ng/g tissue)
Cerebrum	— <sup>b</sup>
Cerebellum	1.52
Liver	—
Lung	—
Heart	—
Kidney	—
Spleen	—
Stomach	—
Thymus	—
Pancreas	—
Small intestine	—
Large intestine	—

<sup>a</sup>Several organs of SD rat were homogenized in 20 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer (1 g tissue/10 ml) and centrifuged 15,000 rpm for 30 min. Then supernatants were centrifuged 40,000 rpm for 60 min. The supernatants were assayed in the sandwich EIA for FGF-9.

<sup>b</sup>Not detected (<0.3 ng/g tissue).

## 3. 考察

FGF-9 の発現部位を調べたところ、成熟ラットで、FGF-9 mRNA は全脳と腎臓に、FGF-9 蛋白は小脳に検出された。In situ ハイブリダイゼーションによって、FGF-9 mRNA は脳の全般にわたって弱く発現しており、小脳では中心部の小脳核で強い発現が認められることが報告された(73)。このことから、FGF-9 蛋白は脳の他の部位では検出されず、小脳でのみ検出されたと考えられる。FGF-9 が生体内で mRNA レベルだけでなく蛋白レベルでも発現していたことから、FGF-9 は生体内で生理的に作用していることが考えられる。また、FGF-9 mRNA は FGF-1、FGF-2、FGF-5 および FGF-10 とは異なる脳内分布を示したことから、FGF-9 が脳で独特な機能を有している可能性が報告された(17,73)。さらに、FGF-9 mRNA はニューロンに選択的に発現されていたことから、FGF-9 は脳内ではニューロンで生合成されていることも報告された(73)。FGF-9 は初代培養グリア細胞の増殖促進活性を有することから(23)、FGF-9 が成長過程でのグリア細胞の増殖や分化、脳損傷後の組織修復や再生、神経細胞の生存や分化、ガン化したグリア細胞の増殖等に関わっている可能性がある。

FGF-9 mRNA は腎臓でも発現されていたが、FGF-9 蛋白は腎臓からは検出されなかった。腎臓での FGF-9 mRNA の発現の生理的意義は不明である。Erythropoietin (EPO) は、腎臓でその mRNA は発現されていたが蛋白はほとんど検出されなかった。このことから、EPO は腎臓で発現、生産されて、内分泌機構で標的部位に作用している可能性があることが報告されている(151)。FGF-9 は分泌蛋白であることから、FGF-9 も腎臓で発現されて内分泌機構で他の臓器に作用している可能性が考えられる。

## 第二章 FGF-9 の分泌機構

一般に分泌蛋白は、付加的なペプチド配列をN末端に持つ前駆体として生合成される。このペプチド部分（シグナルペプチド）がリボソームを誘導して細胞の粗面小胞体膜に結合させる機能を持ち、小胞体上の受容体を介してポリペプチド合成と共役した分泌を遂行させる。一方、シグナルペプチド部分は膜上の特異的なプロテアーゼにより、ポリペプチド合成途中で切断除去される(140,141)。シグナルペプチドは、20~40アミノ酸残基からなること、N末端に近い部分には塩基性のアミノ酸が含まれ、そのあとに疎水性アミノ酸のクラスターがあるなどの共通性が認められている。しかし、個々の分泌蛋白ごとにその一次構造はかなり異なっている(142,143)。

これまで報告されている13種類のFGFファミリー(2-16,19-21,63)のうち、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FGF-8、FGF-10は、いずれも典型的なシグナル配列を持っており細胞外に分泌される。FGF-1とFGF-2はシグナル配列を持っておらず、細胞外には殆ど分泌されないで細胞内にとどまっている(2,4)。これに対して、FGF-9は分泌蛋白であるにもかかわらず、FGF-1あるいはFGF-2と同様にそのN末端には典型的なシグナル配列を有していない(第一編、63)。また、精製された30kDa FGF-9のN末端は4番目のアミノ酸 Leu から始まっており、通常20アミノ酸程度の長さが必要とされるシグナルペプチドが切断されたとは考えにくい。cDNAを導入したCHO細胞の培養上清から精製されたFGF-9は、N末端の翻訳開始Metが欠けているだけであった(第一編、63)。そこで、N末端を33個削ったFGF-9 N33をCOS7細胞で一過性に発現させてFGF-9の分泌機構に検討を加えた。

### 1. 実験材料と方法

#### 1) プラスミドの構築

FGF-9の全構造を含むプラスミドpGAF1(第一編、63)を制限酵素BamHIで切断し、1.55kbの全FGF-9 cDNAを単離した。一方、動物細胞ベクターpTB399(30)を制限酵素BamHIで切断し、IL-2 cDNA領域を除去した後、前記のFGF-9 cDNA 1.55kb断片を挿入して、MuLV-LTRプロモーターの支配下に動物細胞でヒトFGF-9を発現させる発現用プラスミドpRGB12を構築した(Fig.15)。

大腸菌におけるFGF-9 N33発現用プラスミドpETGAF25(第一編)を制限酵素NdeIで切断し、その末端を平滑化した。その後、BamHIリンカーを付け、さらに制限酵素BamHIで十分に切断した後、1.2kbのcDNA断片を単離した。一方、動物細胞ベクターpTB399(30)を制限酵素BamHIで切断し、IL-2 cDNA領域を除去した後、前記のFGF-9 cDNA 1.2kb断片を挿入して、MuLV-LTRプロモーターの支配下に動物細胞でヒトFGF-9 N33を発現させる発現用プラスミドpRGB25-1を構築した(Fig.15)。

尚、動物細胞ベクターpTB399(30)を制限酵素BamHIで切断し、IL-2 cDNA領域を

除去したプラスミドpR-1を作成した。このものは、コントロールのプラスミドとして用いた。

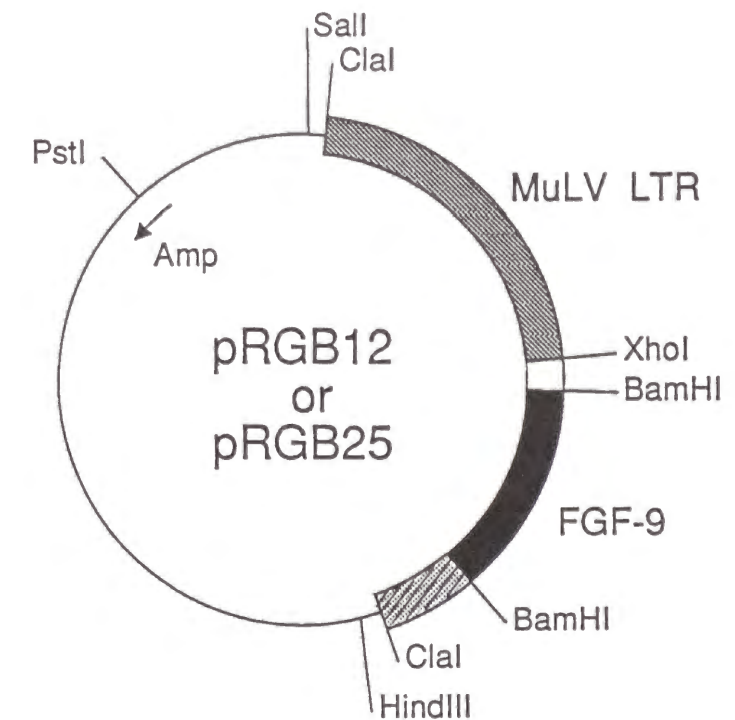


Fig.15 Schematic presentation of pRGB12 or pRGB25, the human FGF-9 or FGF-9 N33 expression vector. The MuLV LTR promoter segment is shown as shaded box. Human FGF-9 or FGF-9 N33 segment is shown as a black box. pBR322 sequences are shown by a single line. The positions of some restriction sites are indicated.



## 2) COS7 細胞への遺伝子の導入

第一編 1-3) に記載した方法で遺伝子の導入を実施した。COS7 細胞に、 $10\mu\text{g}$  の pRGB12、pRGB25-1 あるいは pR-1 を DEAE-dextran 法 (28) によってトランスフェクトした。培養上清と細胞抽出液中の FGF-9 活性を測定した。細胞抽出液は、第一編 1-3) に記載した方法で調製した。

## 3) FGF-9 の生物活性の測定

FGF-9 の生物活性は、ラット初代培養グリア細胞の増殖促進活性を指標にして (23)、第一編 1-4) に記載した方法で測定した。

## 4) ウェスタンブロット解析

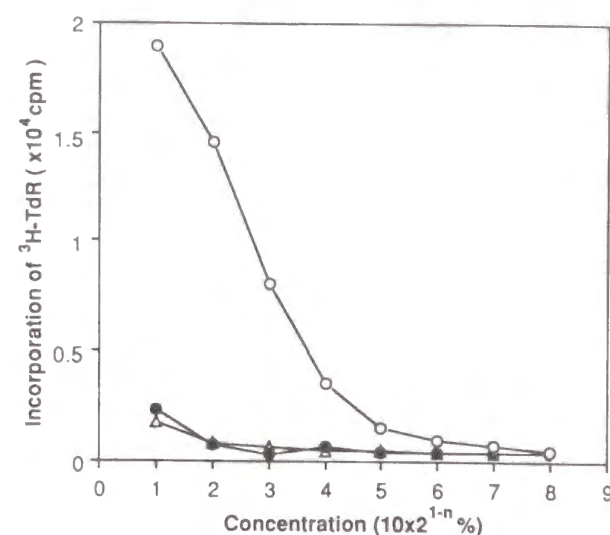
第一編 1-5) に記載した方法で実施した。転写された蛋白は、ウサギ抗 FGF-9 血清 (1000倍希釈)、次いで、アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (7500倍希釈、Promega) と反応させた後、免疫複合体を、Proto Blot Western Blot AP Starter System (Promega) にて検出した。

## 2. 実験成績

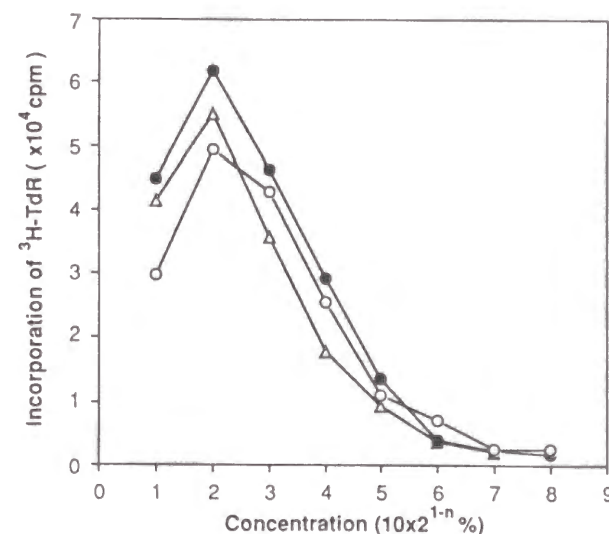
### 1) COS7 細胞で発現させた FGF-9 および FGF-9 N33 の局在性

ヒト FGF-9 N33 を発現させる発現用プラスミド pRGB25-1 を COS7 細胞に導入して、FGF-9 N33 の発現と産物の分泌について検討した (Fig.16)。pRGB12 を導入して FGF-9 を発現させた場合、その活性は培養上清中に検出され、細胞抽出液中にはほとんど認められなかった (Fig.16A,B)。これに対して、FGF-9 N33 を発現させた場合、その活性のほとんどが細胞抽出液中に存在し、培養上清中には僅かに検出されたに過ぎなかった。ウェスタンブロット解析を行ったところ、FGF-9 は培養上清中に 30kDa の大きさで存在しており、細胞抽出液中には存在が認められなかった。一方、FGF-9 N33 は培養上清中にはほとんど認められず、細胞抽出液中に 22kDa の大きさで存在した (Fig.16C)。

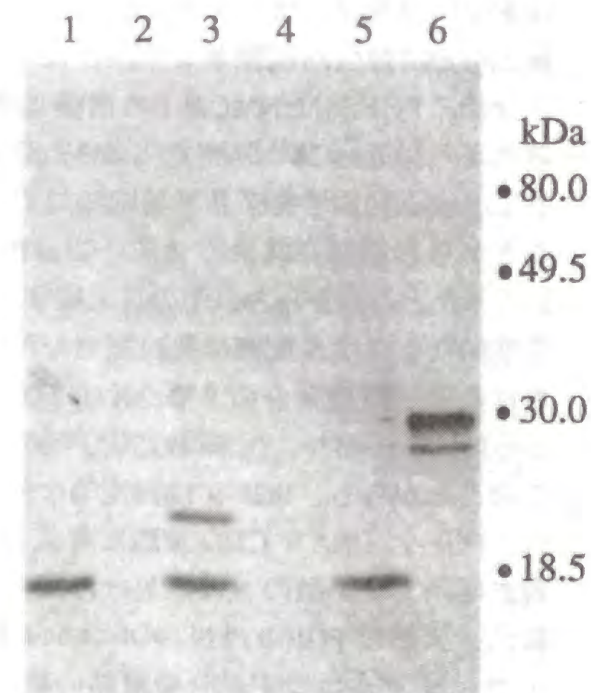
A



B



(C)



**Fig. 16** Localization of FGF-9 after transfection of the cDNA in COS7 cells. COS7 cells (50% confluence in 60-mm dishes) were transfected with  $10\mu\text{g}$  of pRGB12, pRGB25-1, or pR-1 by the DEAE-dextran procedure. After 3 days of transfection, culture supernatants and cell extracts were prepared. The FGF-9 activity was measured by the stimulation of DNA synthesis in rat primary glial cells. (A) FGF-9 activity in culture supernatant. pRGB12 (open circles), pRGB25-1 (closed circles), pR-1 (open triangles). FGF-9 activity was detected in the culture supernatant of pRGB12 transfected cells. (B) FGF-9 activity in the cell extract. pRGB12 (open circles), pRGB25-1 (closed circles), pR-1 (open triangles). FGF-9 activity was minimal in the cell extract of pRGB12 transfected cells, and only a slight FGF-9 activity was detected in the cell extract of pRGB25-1 transfected cells. (C) Western blot analysis. Culture supernatants and the cell extracts were transferred to nitrocellulose membrane and were detected by rabbit anti FGF-9 antibody. Cell extracts; lanes 1, 3, and 5, culture supernatants; lanes 2, 4, and 6, pR-1; lanes 1 and 2, pRGB12; lanes 5 and 6, pRGB25-1; lanes 3 and 4, FGF-9 was detected in the culture supernatant and FGF-9 N33 was detected in the cell extract.

### 3. 考察

FGF ファミリーメンバーのうち FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FGF-8、FGF-10 は 典型的な シグナル配列を持ち、そのうち FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-8、FGF-10 が糖鎖の付加を受けて細胞外へ分泌される (9,11,12,24,63,67)。一方、FGF-1 と FGF-2 には典型的なシグナル配列が存在しないため、直接的には細胞外へ分泌されずにほとんどが細胞内に留まっている (2,4)。これらの 2 つの因子の分泌経路はよくわかっていない。FGF-9 は NMC-G1 の培養上清から精製された因子であることから、分泌蛋白と考えられる。このことは、FGF-9 cDNA を導入した COS7 細胞や CHO 細胞の培養上清中にラット初代培養グリア細胞に対する増殖促進活性を有する FGF-9 蛋白が検出されたことから確認された。ところが、FGF-9 のアミノ酸配列の hydropathy plot 解析(144)を行ったところ (Fig.3)、その N 末端側に疎水性アミノ酸からなるクラスターが存在せず、典型的なシグナル配列は見いだせなかった (第一編、63)。NMC-G1 の培養上清から精製された天然の FGF-9 のうち 30kDa FGF-9 は、cDNA より得られた配列上で 4 番目の Leu から始まっており、N 末端の 3 アミノ酸だけが切断されて細胞外に分泌されていた (23)。このことから、FGF-9 は典型的な分泌シグナル配列を持たないことが示唆される。また、FGF-9 cDNA を CHO 細胞に導入して作製した CDGAF4 細胞が分泌した FGF-9 は、翻訳開始アミノ酸の Met が欠けただけの 2 番目の Ala から N 末端が始まっていた (第一編)。天然の FGF-9 は N-グルコシド結合型の糖鎖が付加しており (23)、アミノ酸配列上でも N-グルコシド結合型糖鎖の結合部位が一カ所存在した (第一編)。また、CHO で産生された蛋白の一部にも糖鎖が付加していたことから、FGF-9 は ER/ゴルジ 経路を通過して分泌されていることが示唆される (63)。

FGF-9 の N 末端配列の 33 アミノ酸を欠失させた FGF-9 N33 を発現する プラスミド pRGB25-1 を COS7 細胞で一過性に発現させたところ、生合成された FGF-9 N33 のほとんどが細胞内にとどまっていた。FGF ファミリーメンバーのひとつである FGF-2 は典型的なシグナル配列を持っておらず、生合成された蛋白のほとんどが細胞内にとどまっている。マウス NIH/3T3 細胞へ FGF-2 cDNA を導入して発現させても、トランスフォーメーションは起こらない (71)。ところが、ヒト IL-2 のシグナル配列あるいはマウス IgG のシグナル配列を FGF-2 の N 末端側につなぐことによって 3T3 細胞のトランスフォーメーションが惹起されることが報告された (Table 5、67,71)。しかし、いずれの場合も細胞外への FGF-2 の分泌量はほとんど増加していなかった。一般に、典型的なシグナル配列を持った蛋白は ER で生合成されさらにゴルジ体で糖鎖が付加されて細胞外へ分泌される (67)。シグナル配列の付加を受けた FGF-2 は、ER/ゴルジの分泌経路に入り、分泌途上で対応するレセプターと結合し、それが増殖シグナルの開始の合図となったと考えられている (130,131)。FGF-9 は 3 kDa の糖鎖の付加を受けて分泌された (23)。一方、分泌されずに細胞内にとどまっていた FGF-9 N33 は、糖鎖の付加部位が残存しているにもかかわらず糖鎖の付加を受けていなかった。このことから、FGF-9 N33 は N 末端のアミノ酸が欠損しているために ER/ゴルジの分泌経路を通ることができなくなったと考えられる (74)。

FGF-2 と FGF-3 は、翻訳開始コドン ATG の上流域に同じ読み取り枠での他の開始

コドン および 停止コドンはない。しかし、ATG のかわりに上流部の CTG コドンを翻訳開始コドンとしてもとの蛋白よりも長い蛋白がそれぞれ合成され、これらがそれぞれの蛋白の細胞内での輸送に関与している可能性が報告された (68-70)。FGF-9 には ATG コドンの上流 147bp に同じ読み取り枠で停止コドンが存在した。FGF-9 の cDNA の上流に CTG コドンが開始コドンのすぐ前に存在した。そこで、ポイントミューテーションによって ATG コドンを GTG コドンに変換したミュータントを作製し COS7 細胞に導入して発現させたが、その培養上清中に FGF-9 活性は検出されなかった (データ不載)。このことから、FGF-9 は開始コドン ATG よりさらに上流から翻訳が開始され、その部分がシグナル配列として機能しているとは考えられない。従って FGF-9 の alternative な翻訳開始部位は 5' 側非翻訳領域には存在せず、Met のコドンから翻訳が開始されていると考えられる。

以上のように、FGF-9 の分泌には N 末端のアミノ酸配列が必要であることが明らかとなった。その分泌には分子内のシグナルが存在するのか、新しい分泌経路が存在するのかは定かではないが、何等かの独特な分泌機構が存在する可能性も考えられる。



## 第三章 血小板産生促進作用

血小板の寿命はヒトで約11日と短いにもかかわらず、末梢血中の血小板数はほぼ一定の値を保っている(75)。これは血小板数を一定に保つようなフィードバック機構があり、血小板産生を刺激する液性の因子、トロンボポエチン、が働いているためと考えられてきた(76-78)。血小板を産生する巨核球は骨髓細胞中の多能性幹細胞から、まず、巨核球へしか分化能のない巨核球系前駆細胞に分化し、さらに巨核芽球、前巨核球、巨核球へと成熟する。巨核球の成熟段階では、細胞は分裂せずに多核化が起こり、核DNA量(プロイディ)が増加する。そして、成熟の完了した巨核球の細胞質から血小板が形成される。巨核球系前駆細胞の分裂、増殖さらに巨核球系の細胞へある程度分化成熟するためには、巨核球コロニー刺激因子(Megakaryocytec colony-Stimulating Factor; MK-CSF)が必要である(79)。さらに、巨核球系細胞の成熟には、巨核球増幅因子(Megakaryocyte Potentiator; MK-POT)が必要であるとされている(80)。近年、分子生物学の進歩により種々のサイトカインが発見され、その多彩な生物活性が明らかにされてきた。そして、*in vitro*においてIL-3とGM-CSFがMK-CSF様活性(81)を有すること、また、IL-6(81,82)、IL-7(83)、IL-11(84,85)、エリスロポエチン(EPO; 82,86)、Leukemia Inhibitory Factor (LIF; 84,87)がMK-POT様活性を有すること、さらに*in vivo*においてIL-1(88,89)、IL-3(90-92)、IL-6(93-97)、IL-11(96,98)、LIF(120)が血小板産生促進作用を有することが報告されてきた。さらに、1994年にcMPLのリガンドが単離され、このものがトロンボポエチンの本体であることが報告された(99-102)。

既知のFGFファミリーメンバーは、線維芽細胞の増殖作用をはじめとして種々の生物活性が報告されている(103-105)。FGF-9は、オリゴデンドロサイトタイプ2アストロサイト前駆細胞、マウスBALB/c線維芽細胞およびラット副腎褐色細胞腫由来PC-12細胞株等の増殖を促進するが、ヒトさい帯血管由来内皮(HUVE)細胞に対しては増殖活性を示さない(第一編、23)。これらに加えて、本研究ではFGF-9が*in vitro*および*in vivo*で巨核球系細胞に対して増殖活性を持つことを発見した。本研究と相前後して、*in vitro*でFGF-1およびFGF-2にMK-CSF様活性があること(106,107)、Brunoら(108)によってFGF-2は直接巨核球系前駆細胞に作用していることが報告された。しかし、FGFファミリーメンバーが*in vivo*で血小板産生促進活性を示すという報告はなかった。ここでは、FGF-9の造血機構ならびに造血臓器への影響を検討した。

### 1. 実験材料と方法

#### 1) 用いた抗体の作製法および由来

ウサギ(JW、14週令、2.7~2.8kg)にフロイント完全アジュバント(Difco)に1mgのrhFGF-9 N33を懸濁したものを皮下接種した。以後2週間間隔で3回フロイント不完全アジュバント(Difco)に1mgのrhFGF-9 N33を懸濁したものを皮下接種した。最終免疫

の1週間後に血清を採取して、IgG画分をプロテインAカラム(ファルマシア)を用いて精製した。

FGF-9に対する2種のモノクローナル抗体、MoAb 150-59 (IgG<sub>1</sub>) および MoAb 40-20 (IgG<sub>1</sub>) は第二編 1-2) に記載した方法で作成した。

マウスIL-3の活性を抑制し、GM-CSFやIL-6に対しては中和活性および交差性のないラット抗mIL-3モノクローナル抗体(MoAb)はGenzyme社より購入した。mIL-6の活性を抑制し、GM-CSFやTNF- $\alpha$ に対しては中和活性がなく、ヒトおよびラットIL-6に交差性がないラット抗mIL-6 MoAbはGenzyme社より購入した。

#### 2) 骨髓細胞の調製

BALB/cマウス(雌、6~8週令、Chales River)の大腿骨より骨髓細胞を採取し、10%のFCSを含むIscove's Modification of Dulbecco's Medium (IMDM、Flow)にて約 $2 \times 10^6$  cells/mlに懸濁し、プラスチックシャーレ上で37°C 45分間インキュベートした。非付着性細胞を集め、血清を除去するためにIMDM培地で洗浄して以下の実験に供した。

#### 3) 液体培養による巨核球増殖活性測定

骨髓細胞の液体培養は無血清条件下で行った(109,110)。非付着性骨髓細胞( $1 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ l)をNeutridoma-SP (Boehringer Mannheim)を含むIMDM培地に懸濁し、種々の因子とともに、96穴プレート(NUNC)に播種した。抗体の中和活性を検討する実験ではrhFGF-9 N3と共にウサギ抗FGF-9抗体、ラット抗mIL-3 MoAbあるいはラット抗mIL-6 MoAbを添加した。37°Cで7日間培養後、5%グルタルアルデヒド(和光純薬)を50  $\mu$ l添加し2000rpmで5分間遠心して細胞を固定した後、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)で洗浄し、アセチルコリンエステラーゼ(AChE)染色を行った(111)。すなわち、ヨウ化アセチルチオコリン(SIGMA)30mgを0.1Mリン酸緩衝液45mlに溶解後、30mM硫酸銅6ml、0.1Mクエン酸ナトリウム3ml、5mMフェリシアン化カリウム6mlを加えたものを用時調製し、培養皿に2ml添加して室温で6時間染色した。

#### 4) FGF-9の投与

rhFGF-9 N3あるいはrhFGF-9 N33は、100  $\mu$ g/ml ウシ血清アルブミン(BSA、Armer)を含有する生理食塩水(大塚製薬)で希釈し、100  $\mu$ lをBALB/cマウス(雌、7週令、1群6匹)に皮下投与した。コントロールとして100  $\mu$ g/ml BSAを含有する生理食塩水を投与した。実験系へのエンドトキシンの寄与を除外するため、全ての投与サンプルはLimulus amebocyte assay (0.5 endotoxin units/ml)によってエンドトキシンの混入をチェックした。

#### 5) 血小板数、赤血球数および白血球数の測定

BALB/cマウス(雌、7週令、1群6匹)に、rhFGF-9 N3あるいはrhFGF-9 N33を1日2回10日間皮下投与した。投与後、経時的にヘパリンをコートしたキャピラリーを用いて眼底静脈叢より採血し、多目的自動血球計数装置(モデルE-2500、東亜医用電子



(株)) にて血小板数、赤血球数 および 白血球数の測定を行った。無処置マウスの末梢血中の血小板数は  $5.76 \pm 0.61 (x10^5/\mu l)$  であった。

#### 6) 抗 FGF-9 モノクローナル抗体の中和活性の検討

BALB/c マウス (7 週令、雌) に  $100 \mu g/ml$  の BSA (Sigma) を含む生理食塩水に溶解した rhFGF-9 N33 ( $50 \mu g$ ) を 1 日 2 回 2 日間皮下投与した。抗体の中和活性を検討する群には rhFGF-9 N33 とモノクローナル抗体 (1 mg) を混合したものを投与した。ヘパリンをコーティングしたキャピラリーで眼下静脈より採血し、多目的自動血球計数装置 (モデル E-2500、東亜医用電子(株)) にて血小板数を測定した。

#### 7) 組織学的検索

rhFGF-9 N33 を 1 日 2 回 10 日間皮下投与した BALB/c マウス (雌、7 週令、1 群 6 匹) の、脾臓、胸腺、肝臓 および 腎臓を摘出し、10% 中性ホルマリン液で固定した。大腿骨も摘出し Plank & Rychlo 法に従って脱灰した。各組織は常法に従ってパラフィン包埋および薄切 ( $5 \mu m$ ) を行い、H.E. 染色後に観察した。また、大腿骨の H.E. 染色標本を用いて、骨髓組織の中で巨核球が多数分布している部位を  $x170$  倍で写真撮影し、一切片あたり  $332,120 \mu m^2$  中の巨核球数を測定した。

#### 8) 骨髓中の巨核球のプロイディ変化

BALB/c マウス (雌、7 週令、1 群 3 匹) に rhFGF-9 N33 を投与した。投与後 3、7、10 日後の動物の大腿骨から骨髓細胞を採取して CATCH 培地 (112) に懸濁した。各群の骨髓細胞はプールして洗浄後、500 倍に希釈した ウサギ抗マウス血小板抗体 (112) に  $1 \times 10^7$  cells/ml の濃度で懸濁し、 $4^\circ C$  で 30 分間インキュベートした。コントロールとして正常ウサギ血清を用いた。CATCH 培地で洗浄後、50 倍に希釈した FITC 標識 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Cappel) に  $1 \times 10^7$  cells/ml の濃度で懸濁し、 $4^\circ C$  で 30 分間インキュベートした。再び CATCH 培地で洗浄後、1% BSA、0.1%  $NaN_3$ 、 $50 \mu g/ml$  ヨウ化プロピディウム (SIGMA) を含む 0.1% クエン酸ナトリウム溶液に  $1 \times 10^7$  cells/ml の濃度で懸濁して  $4^\circ C$  で 2 時間インキュベートした。さらに、リボヌクレアーゼ A (SIGMA) を  $50 \mu g/ml$  になるように添加し、室温でさらに 30 分間インキュベートし、ナイロンメッシュ (#200) を通した後、FACSscan (Bekton Dickinson) で解析した (112,113)。

#### 9) FGF-9 投与マウス骨髓細胞 および 脾臓細胞の液体培養

BALB/c マウス (雌、7 週令、1 群 3 匹) に rhFGF-9 N33 を皮下投与した。投与後 3、6、8、10、13 日目の動物の大腿骨より骨髓細胞を採取し IMDM 培地に懸濁した。また、脾臓より脾臓細胞を採取して IMDM 培地に懸濁した。各群の骨髓細胞 および 脾臓細胞はプールして、4) で述べた方法で非付着性細胞を分取した後、 $10 ng/ml$  の rmIL-3 と共に 7 日間培養を行った。細胞を固定して、AChE 染色した後に巨核球前駆細胞数を測定した。

#### 10) 統計学的解析

全てのデータの群間の有意差検定には Dunnett's の多重比較検定を実施した。

## 2. 実験成績

#### 1) FGF-9 の MK-CSF 様活性

マウス骨髓細胞に rhFGF-9 N3 あるいは rhFGF-9 N33 を添加して、液体培養法にて 7 日間培養した後、巨核球系細胞を AChE 染色した。その結果、rhFGF-9 N3 および rhFGF-9 N33 の両分子に濃度依存的に巨核球系前駆細胞を増殖させる活性 (MK-CSF 様活性) が認められた (Fig.17)。rhFGF-9 N3 の活性は、rhFGF-9 N33 よりも約 3 倍強かった。しかし、その活性は rmIL-3 と比較すると rhFGF-9 N3 で 約 1/30、rhFGF-9 N33 で 約 1/100 であった。さらに、CHO 細胞で発現、生産させた糖鎖が付加した全長の hFGF-9 について (63)、MK-CSF 様活性を測定したところ、rhFGF-9 N3 と同等の MK-CSF 様活性があることを確認した (データ不載)。

このような MK-CSF 様活性が他の既知の増殖因子にも認められるかどうかを検討した。EGF、PDGF、NGF、NT-3 および FGF-2 について検討したが、それぞれ  $1 ng/ml$  から  $1 \mu g/ml$  の濃度では MK-CSF 様活性は全く認められなかった (Fig.18)。

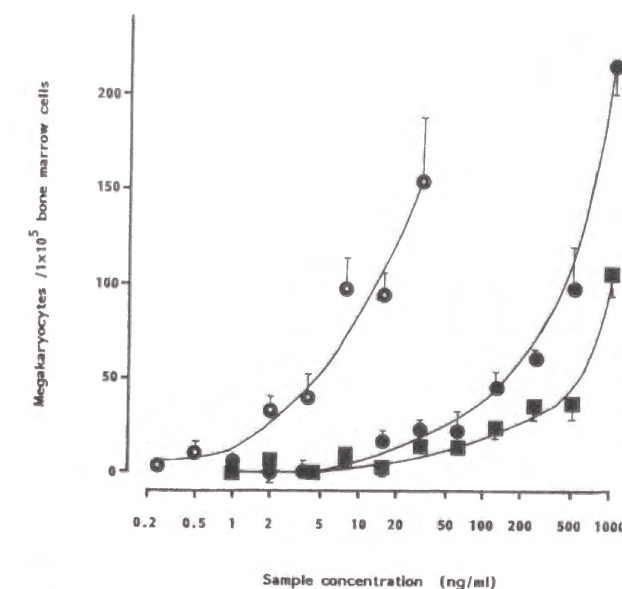


Fig. 17 Megakaryocyte stimulating activity of FGF-9. Non-adherent bone marrow cells ( $1 \times 10^5$ ) were cultured in a liquid culture system for 7 days and megakaryocyte numbers were counted as described in the text. The numbers of megakaryocytes increased in a dose dependent manner. The squares indicate rhFGF-9 N33; the solid circles indicate rhFGF-9 N3; and the open circles indicate rmIL-3.

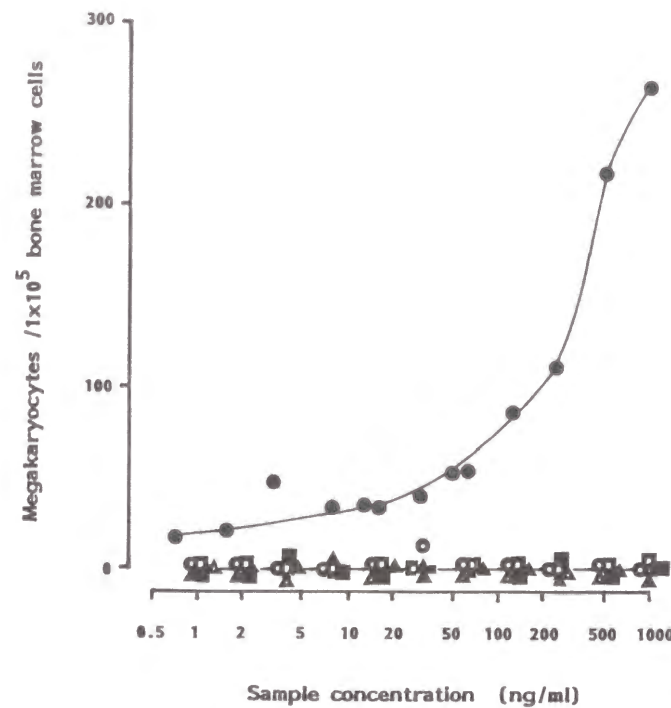


Fig. 18 Megakaryocyte stimulation activity of several growth factors. Nonadherent bone marrow cells ( $1 \times 10^5$ ) were cultured with rhFGF-9 N3 (●), EGF (○), PDGF (△), NGF (□), NT-3 (■), or FGF-2 (▲) in a liquid culture system for 7 days and megakaryocyte numbers were counted as described in the text.

rhFGF-9 の巨核球系細胞に対する増殖促進作用が rhFGF-9 による直接作用であるかどうかを確認するために、FGF-9 に対して中和活性を有する ウサギ 抗 FGF-9 ポリクローナル抗体を培養系に添加した。この抗体は、FGF-9 による ラット初代培養グリア細胞 および A31細胞に対する増殖促進活性 (23) を 約5000倍過剰の濃度で抑制することができる。1000倍過剰量の中和抗体によって rhFGF-9 N3 の MK-CSF 様活性は完全に抑制された (Fig.19A)。また、mIL-3 の活性を 1000倍過剰量で抑制するラット抗 mIL-3 MoAb は rhFGF-9 N3 の MK-CSF 活性を全く抑制しなかった (Fig.19B) 。これらのことから、rhFGF-9 N3 の巨核球系細胞に対する増殖促進作用は、IL-3 の分泌を誘導を介した間接作用ではないことが明らかとなった。しかしながら、mIL-6 に対して中和活性を有するラット抗 rmIL-6 MoAb は、rhFGF-9 N3 の MK-CSF 様活性を抑制した (Fig.19C)。

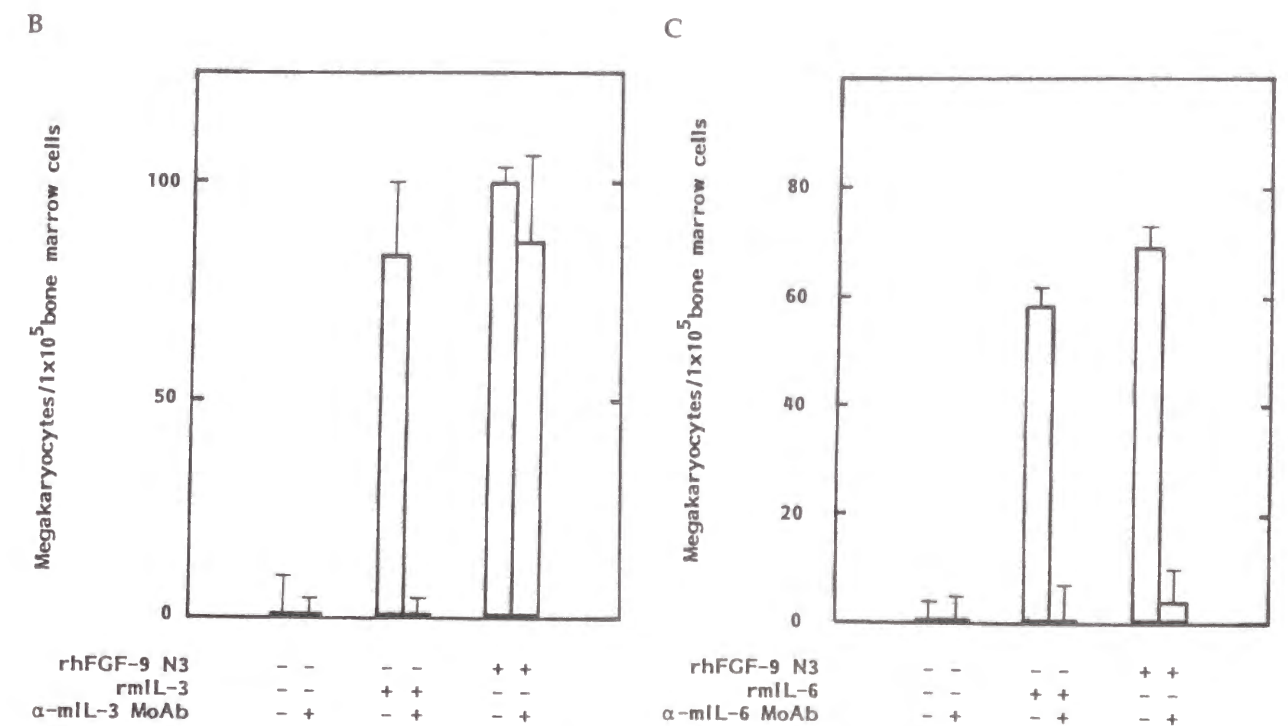
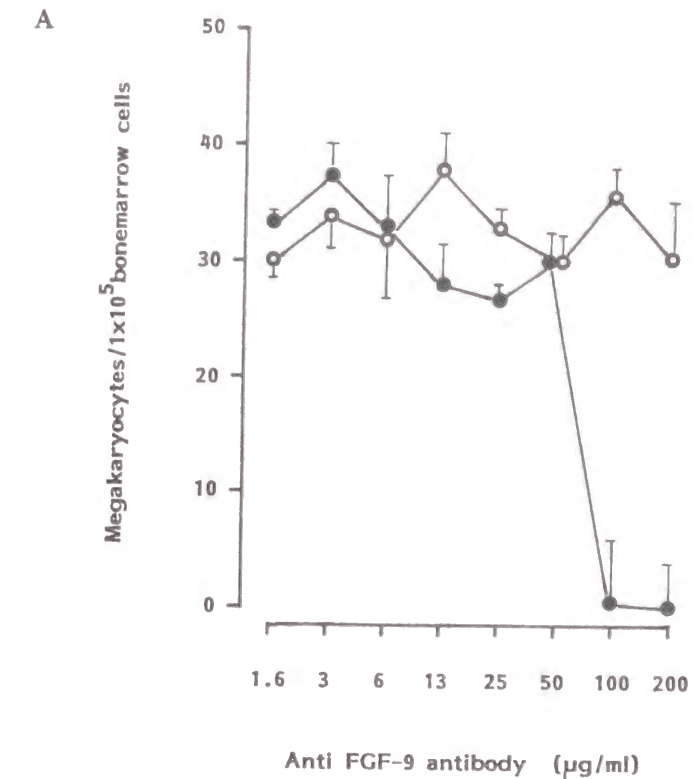


Fig. 19 Neutralization of FGF-9 action by antibodies. A: Rabbit anti-FGF-9 IgG (solid circles) added to the culture neutralized the activity of rhFGF-9. Normal rabbit IgG (open circle) was added as a control. B: RhFGF-9 N3 (500 ng/ml) or rmIL-3 (30 ng/ml) was added to the culture with rat anti-mIL-3 MoAb (30 μg/ml). Rat anti-mIL-3 MoAb did not neutralize rhFGF-9 N3. C: When rhFGF-9 N3 (100 ng/ml) or rmIL-6 (50 ng/ml) was added to the culture with anti-mIL-6 MoAb (30 μg/ml), anti-mIL-6 MoAb did neutralize rhFGF-9 N3.



巨核球系細胞の増殖促進作用に対する rhFGF-9 N3 と rmlL-3 あるいは rhIL-6 の共存効果を検討した (Fig.20)。その結果、rhFGF-9 N3 は IL-3 と相加効果を示した。また、これまでも報告されているが、IL-3 と IL-6 を共存させると相乗効果が認められた (110)。

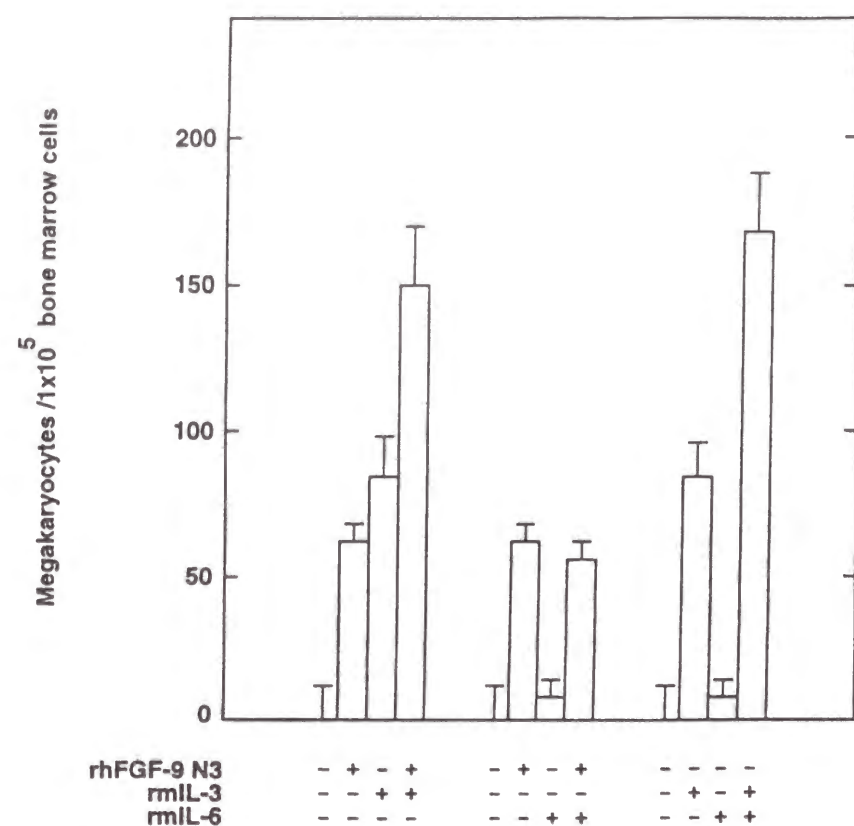


Fig. 20 Combination effects of FGF-9 with IL-3 or IL-6 on megakaryocyte stimulation. Bone marrow cells ( $1 \times 10^5$ ) were cultured with FGF-9 N3 (100 ng/ml), rmlL-36 (40 ng/ml), rmlL-6 (40 ng/ml), or combination of them as indicated in the figure.

## 2) rhFGF-9 N33 の血小板産生促進作用

rhFGF-9 が *in vivo* で血小板産生促進活性を示すかどうかを検討した。マウスに rhFGF-9 N33 を2週間にわたって皮下投与し、経時的に末梢血中の血小板数を測定した。その結果、投与開始後10日目から12日目にかけて一過性に血小板数の上昇が認められた (Fig.21A)。この血小板数の上昇は投与量に依存していた。10  $\mu$ g および 50  $\mu$ g 投与群では血小板数はそれぞれコントロール群の 2.2倍 ( $p < 0.001$ で有意) および 2.3倍 ( $p < 0.001$ で有意) に達した。このとき、白血球数および赤血球数には変化が認められなかった (Fig. 21B,C)。rhFGF-9 N3 の *in vitro* での MK-CSF 様活性は rhFGF-9 N33 よりも強かったが、*in vivo* でのこの2分子種の血小板産生促進作用は殆ど同じであった (Fig.22)。rhFGF-9 N3 は精製中にN末端側が分解され易く単一の標品が得られにくいことから、以下の *in vivo* 実験には精製の簡便な rhFGF-9 N33 を用いることにした。

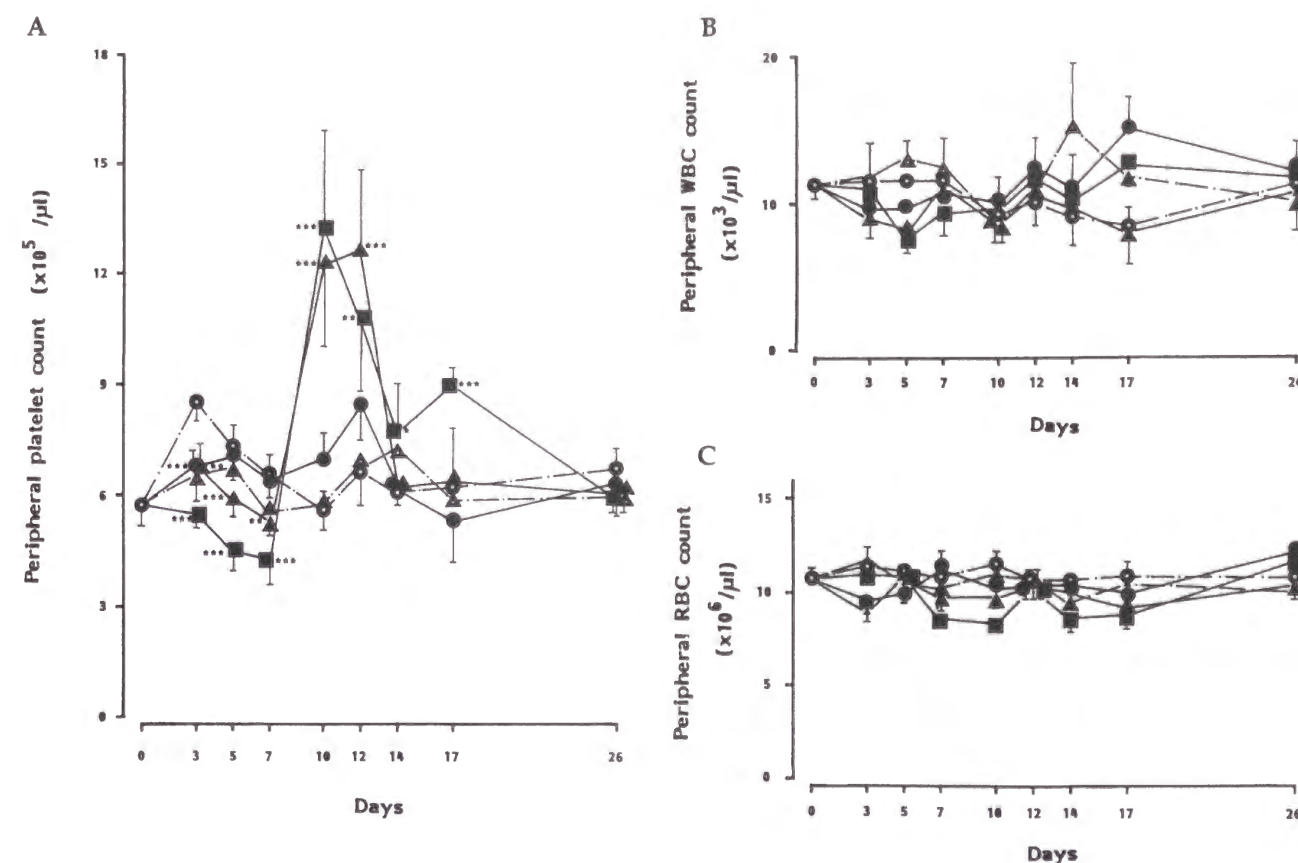


Fig. 21 Augmentation of peripheral platelet counts following FGF-9 administration. BALB/c mice ( $n = 6$ /group) received subcutaneous injection of 2  $\mu$ g (solid circles), 10  $\mu$ g (triangles) or 50  $\mu$ g (squares) of rhFGF-9 N33 twice daily for 14 days. Control mice were given saline (open circles). Complete blood counts were done on days 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, and 26. Mean values  $\pm$  SD are shown. A: A significant increase in peripheral platelet counts is seen. B and C: No significant changes are seen in the number of white and red blood cells. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$  using Dunnett's test.



FGF-9 に対するモノクローナル抗体である MoAb 40-20 および MoAb 150-59 を rhFGF-9 N33 と共にマウスの皮下に投与し、末梢血中の血小板数を測定した (Fig.23)。FGF-9 に対する中和抗体である MoAb 150-59 は rhFGF-9 N33 の血小板産生促進作用を完全に抑制し ( $p < 0.01$ )、生理食塩水のみを投与したコントロール群とほぼ同等の血小板数を示した。MoAb 40-20 は、rhFGF-9 N33 の生物活性に対する影響は認められなかった。

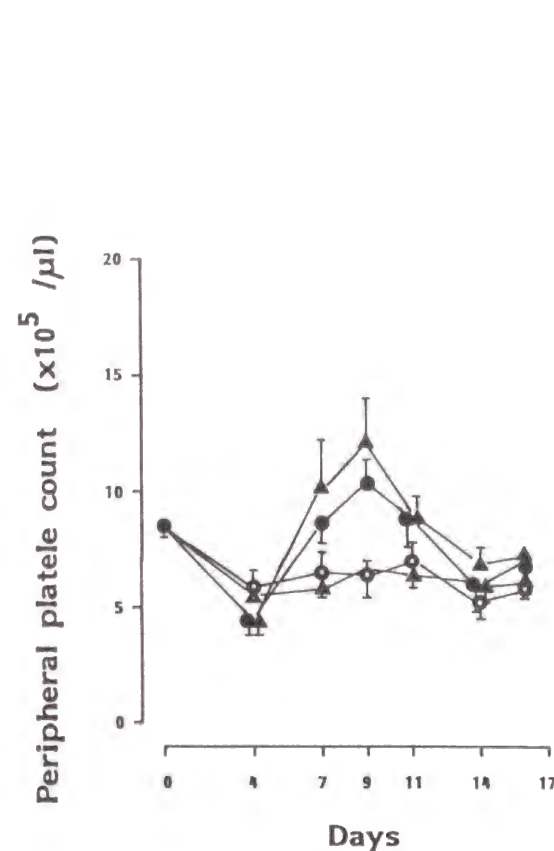


Fig. 22 Augmentation of peripheral platelet counts following FGF-9 administration. BALB/c mice ( $n=6$ /group) received subcutaneous injection of 50 $\mu$ g of rhFGF-9 N3 (●), or rhFGF-9 N33 (▲) twice daily for 14 days. Control mice were given saline (○). The platelet count of untreated control mouse were shown open triangles. Peripheral platelet counts were done on days 0, 4, 7, 9, 11, 14, and 17. Mean values  $\pm$  SD were shown. RhFGF-9 N3 and rhFGF N33 increased the peripheral platelet counts.

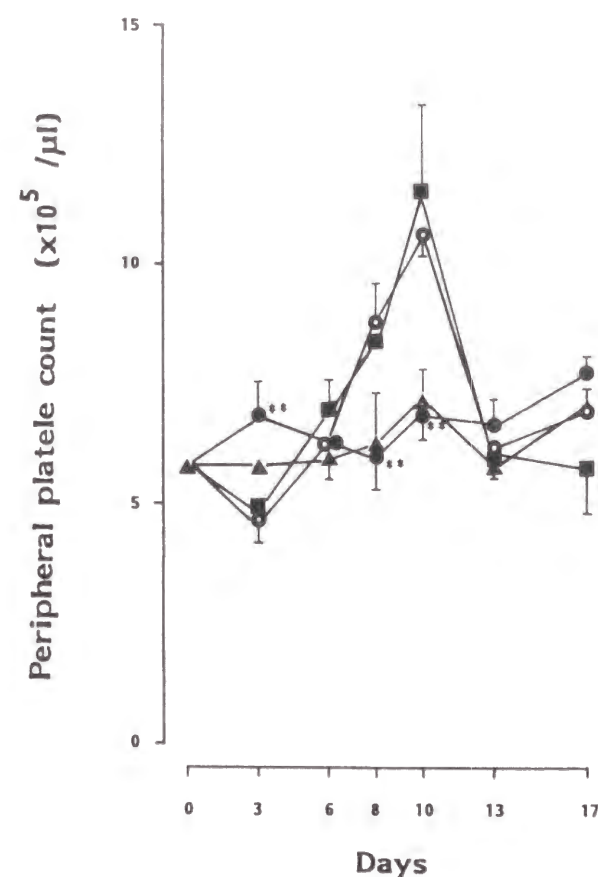


Fig. 23 Neutralization of the *in vivo* thrombopoietic activity of FGF-9 N33 by MAbs. BALB/c mice ( $n = 6$ /group) were given 50  $\mu$ g of rhFGF-9 N33 and 1 mg of MAb 150-59 (solid circles), MAb 40-20 (solid squares), or normal mouse IgG (open circles) two times daily for 2 days by subcutaneous injection. Control mice were given saline (open triangles). Platelet counts were done on days 0, 3, 6, 8, 10, 13, and 17. MAb 150-59 abrogated the increase of platelet production by rhFGF-9 N33. \*\* $p < 0.01$ , using Dunnett's test.

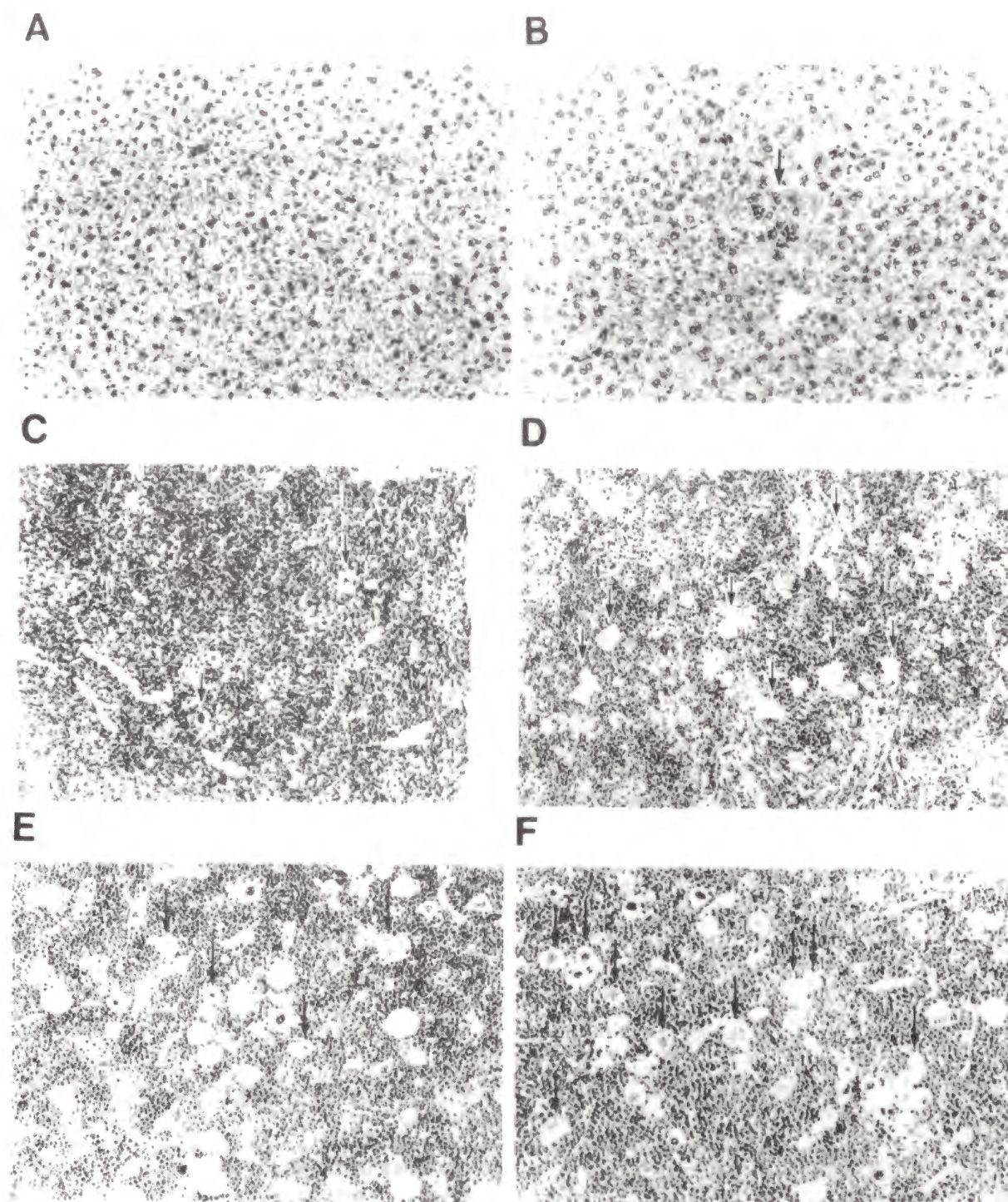


Fig. 24 Microscopic observation of the hematopoietic organs. BALB/c mice ( $n = 6$ /group) were given a subcutaneous injection of 50  $\mu$ g of rhFGF-9 N33 twice daily for 10 days (B, D, F). Control mice were given saline. (A, C, E). Liver (A, B), spleen (C, D), and bone marrow (E, F) specimens were fixed, and sections were stained with H&E ( $\times 170$  magnification). A small focus of extramedullary hematopoiesis (arrow) is seen in (B); a few megakaryocytes are seen in (C); and a large number of megakaryocytes is seen in (D, F).



投与開始後 10 日目の主要臓器について組織学的検索を行った (Fig.24)。肝臓では、rhFGF-9 N33 100  $\mu$ g/day 投与群でシヌソイドに微小な髄外造血巣が軽度認められ、赤芽球系細胞、顆粒系細胞並びに極く少数の巨核球が散在性に認められた (Fig.24A,B)。脾臓では、20  $\mu$ g/day 以上の用量で赤脾髄における髄外造血が著明に増加し、赤芽球系細胞および巨核球の増加が認められた (Fig.24C,D)。白脾髄には、胚中心の形成が認められた。これらの所見は用量依存的に認められた (Table 3)。rhFGF-9 N33 投与によって、骨髓以外の造血臓器で髄外造血が引き起こされたことが明らかになった。骨髓では、巨核球が増加していた (Fig.24E,F)。コントロール群と比較して巨核球の大きさには変化は認められなかったが、rhFGF-9 N33 投与量に依存した巨核球数の増加が認められた (Table 4)。特に、100  $\mu$ g/day 投与群では対照群に比べて有意な ( $p < 0.05$ ) 増加がみられた。なお、腎臓と胸腺には変化は認められなかった (データ不載)。

Table 3  
Effects of rhFGF-9 on the formation of germinal center in spleen

Group	n	Scores	Mean $\pm$ SE
Control	6	0, 0, 0, 0, 0, 0	0
rhFGF-9	4 $\mu$ g	0, 0, 0, 0, 0, 0	0
	20 $\mu$ g	2, 0, 0, 0, 2, 0	0.67 $\pm$ 0.42
	100 $\mu$ g	2, 2, 2, 2, 2, 2	2

Balb/c mice (female, 7-weeks-old, n=6) were given rhFGF-9 by daily subcutaneous injection for 10 days. Control mice were given saline. The formation of germinal center in spleen is expressed as the following scores. Scores (0, 1, 2, 3, 4) indicate that no, slight, mild, moderate and severe change.

Table 4  
Effects of rhFGF-9 on the number of megakaryocytes in bone marrow

Group	n	Number of megakaryocytes mean $\pm$ SE
Control	6	20.8 $\pm$ 1.3
rhFGF-9	4 $\mu$ g	24.3 $\pm$ 2.3
	20 $\mu$ g	27.5 $\pm$ 2.4
	100 $\mu$ g	29.7 $\pm$ 2.1*

BALB/c mice (female, 7-weeks-old, n = 6) were given rhFGF-9 by daily subcutaneous injection for 10 days. Control mice were given saline. The number of megakaryocytes in the femoral bone marrow is expressed as the number per unit area (332 120  $\mu^2$ ).

\*Significantly different from the control group. (Dunnett's test,  $P < 0.05$ ).

次に、rhFGF-9 N33 の投与回数について検討した。rhFGF-9 N33 100  $\mu$ g を 1 回だけ、50  $\mu$ g を 1 日 2 回あるいは 50  $\mu$ g を 1 日 1 回 2 日間に分けて投与した。いずれの群でも、投与開始後 9 日目にコントロール群に対して 1.5 倍の末梢血中の血小板数の増加が認められた (Fig.25)。連続投与を行った場合よりも血小板数増加のピークは 1 ~ 2 日早かった。

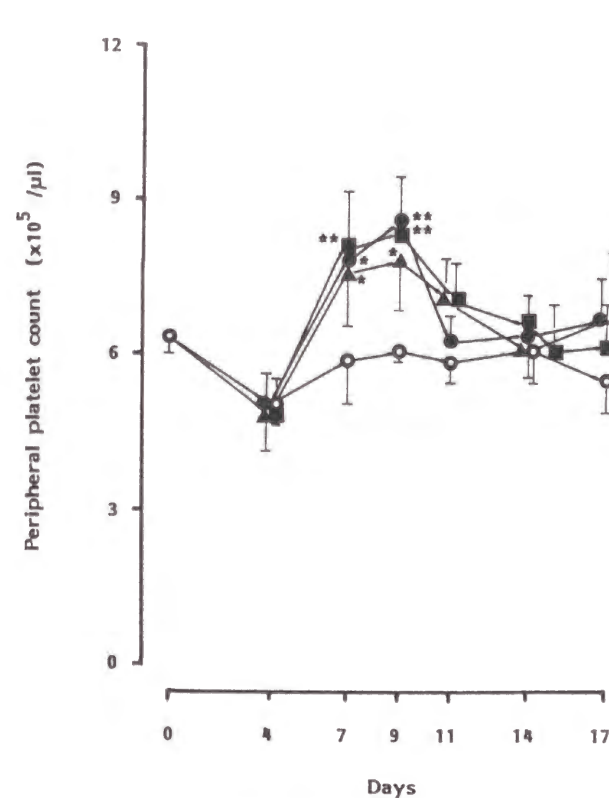
3) rhFGF-9 N33 投与による骨髓中の巨核球の核 DNA 量 (プロイディ) 変化

上述したように、100  $\mu$ g の rhFGF-9 N33 は単回投与で十分に血小板産生を促進した。そこで、以下の実験では、rhFGF-9 N33 を 2 日間だけ投与することにした。

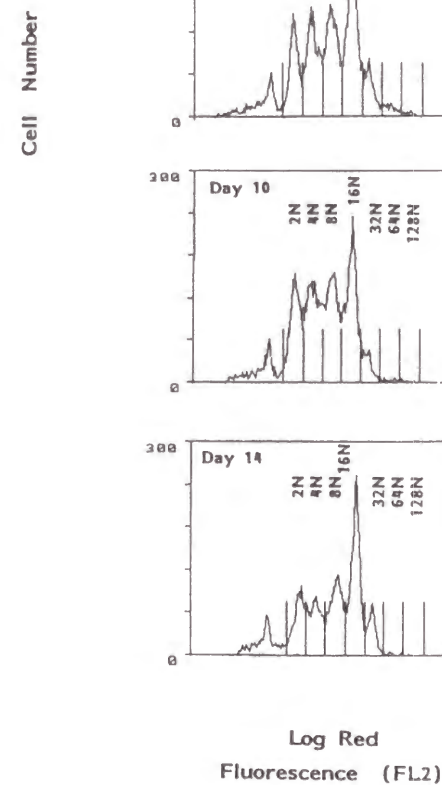
rhFGF-9 N33 投与マウスの骨髓の巨核球系細胞のプロイディの変化を観察した。正常マウスの骨髓中の巨核球のプロイディの分布は、16N 巨核球が最も多く全体の約 35% を占めている。rhFGF-9 N33 を投与して 3 日後にはこの分布は全体的にプロイディの低い方へとシフトし、2N の細胞が全体の 40% 近くを占めた。その後、日を追って徐々にプロイディの高い方へとシフトし、10 日後には正常マウスと同様の分布に戻った (Fig. 26)。コントロールマウスではプロイディ分布の変化は認められなかった。

4) rhFGF-9 N33 投与による骨髓 および 脾臓中の巨核球前駆細胞数の変化

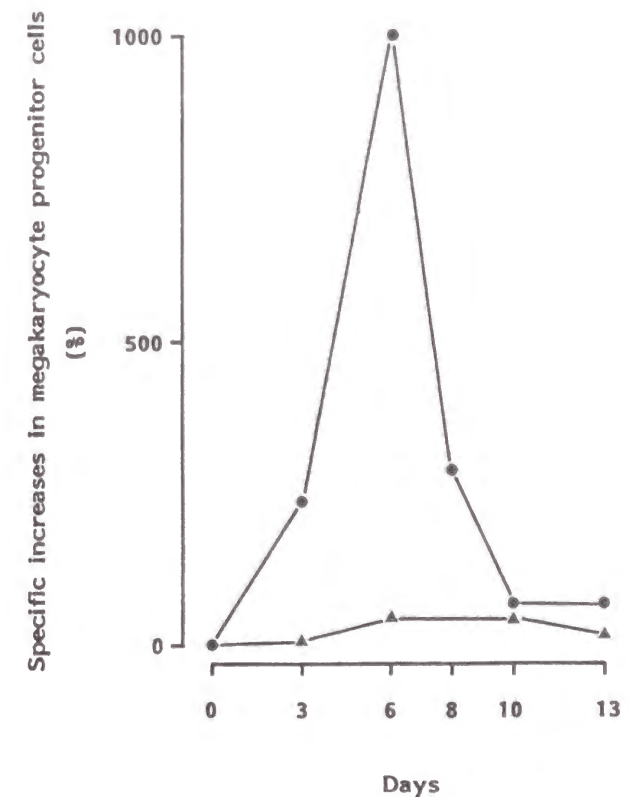
rhFGF-9 N33 投与後のマウスの骨髓 および 脾臓中の巨核球前駆細胞を経時的に測定した。マウスに rhFGF-9 N33 を投与したところ、巨核球前駆細胞の割合は骨髓と脾臓の両方で増加し、6 日目でピークとなり (それぞれ コントロールに対して 151%、1145%)、その後減少した (Fig.27)。脾臓での巨核球系前駆細胞の割合はコントロール群に比べて rhFGF-9 N33 投与群でかなり高かった。6 日目の骨髓と脾臓の巨核球前駆細胞数を Table 5 に示した。



**Fig. 25** Platelet increase caused by single or dual FGF-9 administration. BALB/c mice ( $n = 6/\text{group}$ ) received a single subcutaneous injection of  $100 \mu\text{g}$  of rhFGF-9 N33 (squares). Additional groups of mice ( $n = 6/\text{group}$ ) were given  $50 \mu\text{g}$  of rhFGF-9 N33 twice: at 0 and 8 hr (solid circles) or 0 and 24 hr (triangles). Untreated controls (open circles). Platelet counts were measured on days 4, 7, 9, 11, 13 and 17. Mean values  $\pm$  SD are shown. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .



**Fig. 26** Changes in the ploidy distribution of megakaryocytes after FGF-9 administration. BALB/c mice ( $n = 3/\text{group}$ ) were given  $50 \mu\text{g}$  of FGF-9 N33 three times daily for 2 days by subcutaneous injection. Bone marrow cells were analyzed by two-color flow cytometry, a base line histogram being obtained on day 0 before treatment. The proportion of megakaryocytes of low ploidy is expressed as a percentage of the total nucleated cell population: 0.16% for controls; 0.25% for day 3; 0.32% for day 7; 0.38% for day 10; and 0.20% for day 14.



**Fig. 27** Increase of megakaryocyte progenitors. BALB/c mice ( $n = 3/\text{group}$ ) were given  $50 \mu\text{g}$  of rhFGF-9 N33 three times daily for 2 days by subcutaneous injection. At designated time points, bone marrow cells (triangles) and spleen cells (circles) were collected and cultured with  $10 \text{ ng/ml}$  of mIL-3 for 7 days. The proportion of megakaryocyte progenitor cells increased markedly up to 1.5-fold in the bone marrow and 10-fold in the spleen compared to controls on day 6 following rhFGF-9 N33 administration.

**Table 5**  
Effects of rhFGF-9 on the number of megakaryocyte progenitors

	rhFGF-9	Normal
Bone marrow	$227 \pm 40$	$150 \pm 27$
Spleen	$110 \pm 22$	$9.6 \pm 3.5$

BALB/c mice were given an injection of  $50 \mu\text{g}$  of rhFGF-9 N33 three times daily for 2 days. After 6 days,  $1 \times 10^5$  bone marrow cells and  $1 \times 10^6$  spleen cells were collected and cultured with  $10 \text{ ng/ml}$  mIL-3 for 7 days. Cells were fixed and the numbers of megakaryocytes were assessed after histochemical staining for AcChEase.

Values are the mean  $\pm$  SD from three animals in each group.



### 3. 考察

rhFGF-9 N33 はN末端の33アミノ酸を欠失させた組換え FGF-9 で  $^{34}\text{Ser}$  より C 末までの 175 アミノ酸から、rhFGF-9 N3 はN末端の 3 アミノ酸を欠失させた組換え FGF-9 で  $^{4}\text{Leu}$  より C 末までの 205 アミノ酸からなるポリペプチドである。rhFGF-9 N3 および rhFGF-9 N33 の両分子、さらに CHO 細胞で発現させた糖鎖が付加した hFGF-9 に *in vitro* で巨核球系細胞数を増加させる活性があることが明らかになった。この活性は、FGF-9 に対する中和抗体によって完全に抑制された。グリア細胞の増殖促進活性に関しては、rhFGF-9 N3 と rhFGF-9 N33 の間では後者の方が約 2～3 倍強かった (第一編)。逆に、巨核球系前駆細胞に対する増殖促進活性は、rhFGF-9 N3の方が rhFGF-9 N33 に比べて約 3 倍高い比活性を示した。FGF-9 の N 末端側の配列が *in vitro* での生物活性の強弱に関与していることも考えられる。

MK-CSF 様活性が他の既知の増殖因子にも認められるか否かを検討した。FGF-9 が MK-CSF 様活性を示す濃度範囲 (1～10  $\mu\text{g/ml}$ ) では、EGF、PDGF、NGF、NT-3 および FGF-2 には MK-CSF 様活性は全く認められなかった。本研究と相前後して、FGF-1 と FGF-2 に MK-CSF 様活性が認められることが報告された (106,107)。しかしながら、著者らが行った液体培養系では FGF-2 には巨核球系細胞数を増加させる活性は認められなかった。液体培養系では巨核球細胞にコロニーを形成させることは難しいため、FGF-2 に MK-CSF 様活性が認められなかったのかも知れない。

FGF-9 の骨髓細胞中の種々の白血球系前駆細胞に対する増殖作用を検討した。マウス骨髓細胞を rhFGF-9 N3 あるいは FGF-9 N33 と共に軟寒天中で培養したところ、かなりの高濃度 (0.1～1  $\text{mg/ml}$ ) を添加したときにのみ種々の顆粒球系の細胞のコロニーが増加した。しかし、その活性は弱いものであった (データ不載)。このことから、FGF-9 は生理的な条件下では白血球系前駆細胞に対しては CSF 様活性を持たないと思われる。

FGF-9 の MK-CSF 様活性が、骨髓細胞から産生される可能性のあるサイトカインの関与によるものかどうかを調べる為、抗 mIL-3 MoAb あるいは抗 hIL-6 MoAb を培養系に添加して、その影響を調べた。rhFGF-9 N3 の MK-CSF 様活性は抗 mIL-3 MoAb によって抑制されなかったことから、rhFGF-9 N3 の MK-CSF 様活性は IL-3 の誘導を介した間接的な活性ではないことが示される。これに対して、抗 mIL-6 MoAb が FGF-9 の MK-CSF 様活性を抑制した。ここで用いた抗 mIL-6 MoAb は IL-3 の MK-CSF 様活性を抑制しなかった (データ不載) ことから、この中和活性は非特異的な抑制ではないと考えられる。FGF-1 あるいは FGF-2 に認められる *in vitro* での MK-CSF 様活性は、IL-6 の誘導を介した間接的な作用である可能性が報告された (106)。これと同じように、FGF-9 が *in vitro* で IL-6 産生を誘導して MK-CSF 様活性を示した可能性は否定できない。しかしながら、1) 液体培養系では IL-6 の MK-CSF 様活性は弱いとの報告があること (106)、2) FGF-9 で刺激した骨髓細胞の培養上清中に IL-6 は検出されなかった (<15  $\text{pg/ml}$ ) こと、3) FGF-9 によって IL-6 が誘導されていたとしても (<15  $\text{pg/ml}$ )、この量だけでは MK-CSF 様活性を示すには不十分と思われること、4) IL-1 $\beta$  は IL-6 産生を誘導するが、*in vitro* では MK-CSF 様活性を示さないこと (88,89)、5) *in vivo* での rhFGF-9 N33 投与実験の結果、FGF-9 は巨核球前駆細胞の増加を支持していること、6) FGF-9 は、巨核球の分

化、成熟に作用を持つと報告されている IL-6 (113) とは作用点異なること、などの諸点から FGF-9 の作用が IL-6 を介したものであるとは考えにくい。今回用いた液体培養系では AChE 染色によって成熟巨核球を検出しているため、抗体添加によって IL-6 を中和したときに FGF-9 の MK-CSF 様活性が抑制されたかのように観察されたとも考えられる。

マウスに rhFGF-9 N33 を 14 日間にわたって皮下投与したところ、投与量に依存した末梢血中の血小板数の増加が認められた。FGF-9 に対して中和活性を持たない抗体である MoAb40-20 は、*in vivo* で rhFGF-9 N33 による血小板産生促進作用を抑制しなかったが、FGF-9 の中和抗体である MoAb150-59 は *in vivo* で rhFGF-9 N33 による血小板産生促進作用を完全に抑制した (123)。このことから、FGF-9 の *in vivo* における血小板産生促進作用がこの因子の直接的な作用であることが示唆される。FGF-9 投与マウスの骨髓では巨核球が有意に増加し、肝臓や脾臓でも髄外造血の亢進が認められた。FGF-9 を 14 日間連続投与したにも拘らず、血小板のレベルは 14 日目までに正常レベルに戻った。この理由として、過剰量の FGF-9 がネガティブフィードバックを引き起こし、レセプターのダウンレギュレーションによってシグナルが伝達されなくなった可能性が考えられる。一方、50  $\mu\text{g}$  投与群では 3～7 日目に血小板レベルの低下が認められた。しかし、このような初期の血小板レベルの低下が認められない 2  $\mu\text{g}$  投与群でも血小板産生の促進が認められたことから、この初期の血小板レベルの低下のリバウンドとして後の血小板数の増加が起こったのではないと思われる。

FGF-9 遺伝子を導入した FGF-9 を分泌するトランスフォーマントである ATG5 細胞 (第三編第四章、55) を BALB/c ヌードマウスに接種したところガン形成した。さらに、形成されたガン組織を BALB/c マウスの皮下に移植したところガンが生着した。これらマウスの末梢血中の血小板数は、コントロール群に対して 1.5～2 倍に増加しており、高血小板レベルに保たれていた (データ不載)。トランスフォーマントから産生される持続的な FGF-9 の分泌が、FGF-9 の投与よりも顕著な効果を与えることも考えられる。

rhFGF-9 N33 100  $\mu\text{g}$  を 1 回だけ、50  $\mu\text{g}$  を 1 日 2 回あるいは 50  $\mu\text{g}$  を 1 日 1 回 2 日間に分けて投与したところ、いずれの群でも投与開始後 9 日目にコントロール群に対して 1.5 倍の末梢血中の血小板数の増加が認められた。連続投与を行った場合よりも血小板数増加のピークは 1～2 日早かった。現在のところ、この現象が何に起因するものかは不明である。

rhFGF-9 N33 の投与開始後 3 日目には骨髓中の巨核球のプロイディ分布 (ピークは 16N の巨核球) は全体的に低い方へとシフトし、2 N 巨核球がピークとなった。その後、徐々にピークは 16 N 巨核球へとシフトし、血小板の産生増加が認められる 10 日目には正常の分布に戻った (Fig.26)。また、rhFGF-9 N33 投与によって、骨髓と脾臓の双方で巨核球系前駆細胞の割合が増加し、投与開始後 6 日目にピークを示した (Fig.27)。また、rhFGF-9 N33 の投与により骨髓中の巨核球の数は増加したが、巨核球の大きさは変わらなかった。これらの結果は、FGF-9 が *in vivo* で 2 倍体の巨核球前駆細胞を増加させ、末梢血中の血小板数が増加したことを示唆している。一方、IL-6 投与による骨髓中の巨核



球のプロイディ分布の変化は、FGF-9 投与時とは全く違う変化を示すことが報告されている。すなわち、IL-6 投与によって血小板産生が促進される時期（投与後 5～7 日後）と相前後して骨髓中のプロイディの分布は全体的に高い方へとシフトし（32N、64N 巨核球の割合の増加）、巨核球の大きさが大きくなる（84,93-97,114,122）。この結果は、IL-6 が巨核球の分化の後期 および 成熟期に作用する という *in vitro* の結果をよく反映している（109）。マウスにおいては、巨核球前駆細胞から血小板を産生しうる成熟型巨核球に分化するまでに 6 日を要すると考えられている。FGF-9 投与によって巨核球系前駆細胞の占める割合が投与開始後 6 日目にピークとなったことから、血小板数は投与開始後 12 日目あたりにピークとなることが予想される。事実、FGF-9 投与開始後 10～12 日後に末梢血中の血小板数が増加した。巨核球の分化の初期に作用するとされる IL-3 の血小板増加作用の発現は投与開始後 12～14 日後で、血小板増加作用の発現が投与開始後 5～7 日後である IL-6 に比べるとかなり緩徐であることが報告されている（90,91）。このことから、FGF-9 は巨核球分化の初期段階に作用していると思われる。FGF ファミリーメンバーのひとつである FGF-2 が *in vitro* で直接分化初期段階の巨核球系前駆細胞に作用しているという報告もある（108）。

FGF ファミリーは互いに相同性が高いポリペプチド鎖から構成されており、重複した生物活性を有している（103-105）。また、FGF ファミリーのレセプターも、チロシンキナーゼ活性を有した 4 種類のよく似た分子種よりなるファミリーを形成しており（FGFR-1 (flg)、FGFR-2 (bek)、FGFR-3 (CEK-2)、FGFR-4)、FGFR-4 以外の FGF レセプターは、それぞれ alternative splicing によって細胞外ドメイン部分に "b" と "c" と呼ばれる分子種が形成される（115-119）。FGF ファミリーはこれらレセプターに多対多対応をなして結合しており、FGF ファミリーの広範な生物活性は、リガンドとこれら種々のレセプターとの少しずつの親和性の違いから発揮されるのではないかと考えられている。マウス FGF-9 は FGFR 2c と FGFR 3c に結合して活性化することに加えて、FGF-2～FGF-8 とは異なり FGFR 3b も活性化できることが報告された（145）。巨核球系の細胞あるいは巨核球系の細胞株に FGFR-1 および FGFR-2 が発現されており、巨核球の増殖に関与している可能性が報告された（106）。このことから、FGF-9 が FGFR-2 に結合して巨核球系細胞の増殖を促進したことも考えられる。また、巨核球に分化しうる ヒト leukemia 細胞株 HEL や CMK で FGF-6 遺伝子が発現されているという報告もある（12）。FGF-6 が FGFR-1 や FGFR-2 を介してオートクライン様に HEL や CMK に作用し、自律的増殖能を獲得したとすれば興味深い。

FGF ファミリーメンバーが *in vivo* で血小板産生促進活性を示すという報告はこれまでなかったが、本研究により FGF-9 が *in vivo* 血小板産生促進活性を有することが初めて明らかとなった。さらに、FGF-4 が *in vitro* で MK-CSF 様活性を示し、*in vivo* で血小板産生促進活性を示すこと、FGF-6 が *in vivo* で血小板産生促進活性を示すことも見いだしている（データ不載）。他の FGF ファミリーメンバーについてもこのような血小板産生促進活性が認められるかどうかを検討する必要がある。FGF-9、FGF-4 および FGF-6 は巨核球上の共通のレセプターを介して作用していることも考えられる。

## 第四章 FGF-9 のガン原性

細胞が細胞増殖因子を恒常的に大量に産生し、その細胞のレセプターを介して自らの増殖を異常に促進することが、すなわち、細胞増殖因子のオートクライン分泌が、細胞のガン化の一因となっていると考えられている（124）。実際に、いくつかのオンコジンの産物は細胞増殖因子 または そのレセプターである。このことから、正常細胞の増殖抑制と発ガンとの間の分子レベルでのつながりが明らかにされてきた（124-126）。クローニングされた細胞増殖因子遺伝子をその受容体を持つ細胞に導入して発現させることにより、直接的にその遺伝子の発ガン活性を検討することができる。実際に、ヒト c-sis (PDGF  $\beta$  鎖をコードする遺伝子)（127）、ヒト TGF $\alpha$ （128）、ヒト EGF（129）やヒト FGF-2（62）が、オートクライン機序によって細胞をトランスフォームしうることが報告されている。一方、FGF-2 の場合には、レセプターが細胞表面に到達する前に細胞内で増殖因子と結合している可能性を示す報告もある（130-131）。

FGF ファミリーには現在 13 種類が報告されている。FGF ファミリーのうち FGF-1、FGF-2、FGF-3、FGF-4、FGF-5 および FGF-6 は、PDGF、TGF- $\alpha$  等の増殖因子と同様にオンコジーンとしての性質を有していることが知られている。特に FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6 は元来 オンコジーンとして分離されてきたものである（5,7-11,13,18-22）。本研究では、FGF-9 cDNA をマウス BALB/c 3T3 A31 細胞に導入することによって FGF-9 がオンコジーンとしての性質を備えているかどうかを検討した。その結果、FGF-9 もガン原性を持つことが示唆された。ヒト胃ガン細胞株 AZ-521 の培養上清中に FGF-9 が検出されたことから（第二編 Table 1、123）、FGF-9 が AZ-521 のガン化に何らかの役割を果たしている可能性についても考察する。

### 1. 実験材料と方法

#### 1) プラスミドの構築

Abelson マウス白血病ウイルス (MuLV)-LTR プロモーターの支配下に動物細胞でヒト FGF-9 を発現させる発現用プラスミド pRGB12 およびヒト FGF-9 N33 を発現させる発現用プラスミド pRGB25-1 は、第三編 第二章 1-1) に記載した方法で構築した (Fig.15)。動物細胞ベクター pTB399 (30) を制限酵素 BamHI で切断して、IL-2 cDNA 領域を除去したプラスミド pR-1 は、コントロールのプラスミドとして用いた。

MuLV-LTR プロモーターの支配下に、IL-2 のシグナル配列をつないだ FGF-2 前駆体（成熟型 FGF-2 の N 末端に 9 アミノ酸残基が付加したもの）を組み込んだプラスミド pTB1001 (71) は、トランスフォーメーション実験においてポジティブコントロールとして使用した。



## 2) 組換えヒト FGF-9 (rhFGF-9) と抗 FGF-9 抗体

大腸菌で産生させた rhFGF-9 は、第一編 1-8) に記載した方法に従って調製した。

ウサギ抗 FGF-9 中和抗体 (65) は、第三編 第三章 1-1) に記載した方法で作成した。ウェスタンブロット解析には抗血清をそのまま使用した。

FGF-9 に対する 2 種のモノクローナル抗体、MoAb 150-59 (IgG<sub>1</sub>) および MoAb 40-20 (IgG<sub>1</sub>) は第二編 1-2) に記載した方法で作成した。

## 3) BALB/c 3T3 A31-1-1 細胞への遺伝子の導入

マウス BALB/c 3T3 A31-1-1 細胞 (A31 細胞、66) は 10% ウシ血清 (calf serum; CS、Flow) を含む DMEM 培地 (Flow) で培養した。A31 細胞 ( $1 \times 10^5$  個) を 60mm 組織培養用ディッシュ (Falcon) に播種し、翌日にリン酸カルシウム法 (132) にて発現用ベクター pRGB12、pRGB25-1、pR-1 あるいは pTB1001 (71)  $10 \mu\text{g}$  をトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞は 5% CS DMEM 培地で 4 週間培養し、冷メタノールで固定した後、ギムザ染色し、フォーカスを数えた。

## 4) FGF-9 の生物活性の測定

FGF-9 の生物活性は、ラット初代培養グリア細胞の増殖促進活性を指標にして、第一編 1-4) に記載した方法で測定した (23)。

## 5) ウェスタンブロット解析

第一編 1-5) に記載した方法で実施した。ニトロセルロース膜に転写された蛋白は、ウサギ抗 FGF-9 血清 (1000 倍希釈)、次いで、アルカリフォスファターゼ 標識抗 ウサギ IgG 抗体 (2500 倍希釈、Promega) と反応させた後、Proto Blot Western Blot AP Starter System (Promega) にて検出した。

## 6) ATG 細胞の樹立

A31 細胞に、 $10 \mu\text{g}$  の pRGB12 をリン酸カルシウム法にてトランスフェクションした (132)。フォーカスフォーミング法にてトランスフォーマントを選出し、限界希釈法にて ATG1、ATG2、ATG3、ATG4 および ATG5 の 5 つのクローンをクローニングした。

## 7) 軟寒天培地中でのコロニー形成

0.5% Bacto-Agar (Difco)、10% FCS を含む DMEM 培地を 35mm 組織培養用ディッシュに 2 ml ずつ分注した。細胞はトリプシンで剥して、0.3% Bacto-agar、10% FCS を含む DMEM 培地に  $1 \times 10^4$  cells/ml となるように懸濁し、1 ml ずつ先の培地の上に重層した。抗体の作用を調べる実験では、 $10 \mu\text{g/ml}$  のウサギ抗 FGF-9 抗体を細胞懸濁液に添加した。37°C で 2 週間培養した後、生細胞からなるコロニーを iodonitrotetrazolium で染色してカウントした (71,128)。

## 8) 坦ガンマウスの作製

各抗体は生理食塩水に溶解した。BALB/c ノードマウス (nu/nu) (雌、8 週令、Chales River、1 群 5 匹) に、*in vitro* で培養した ATG5 細胞  $1.5 \times 10^6$  個を皮下に接種し、3 日後あるいは 11 日後からそれぞれ 5 日間にわたって  $200 \mu\text{g/mouse/day}$  の抗体を静脈内 (i.v.) 投与し、ガンの体積を経時的に測定した。コントロール群には正常マウス IgG を投与した。

別の実験では、BALB/c ノードマウス (雌、8 週令、1 群 6 匹) に、*in vitro* で培養した AZ-521 細胞  $3 \times 10^6$  個を皮下に接種し、11 日後と 18 日後よりそれぞれ 5 日間にわたって  $200 \mu\text{g/mouse/day}$  の抗体を i.v. 投与し、ガンの体積を経時的に測定した。コントロール群には正常マウス IgG を投与した。

ガンの体積は (ガンの幅)<sup>2</sup> x (ガンの長さ) / 2 で算出した。

## 9) 細胞培養

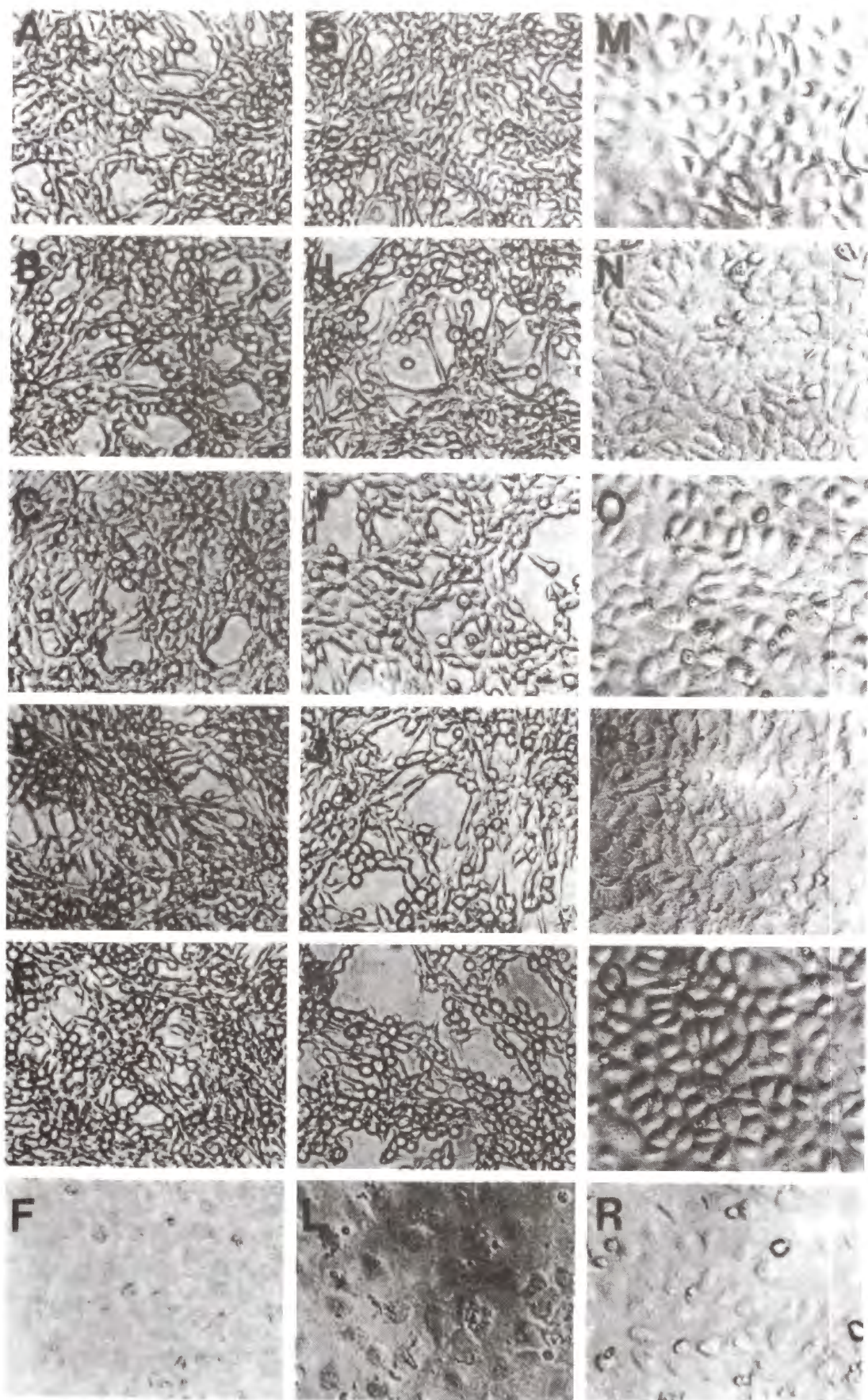
NMC-G1 あるいは AZ-521 ( $2 \times 10^4$  個) を 2 ml の 5% FCS DMEM 培地に懸濁し、24 穴組織培養用プレート (rinbro、Flow) に播種した。ここに、種々の濃度の抗体、あるいは  $20 \mu\text{g/ml}$  のヘパリンを共存させた。7 日間の培養後、細胞数をコールターカウンターで数えた。

## 2. 実験成績

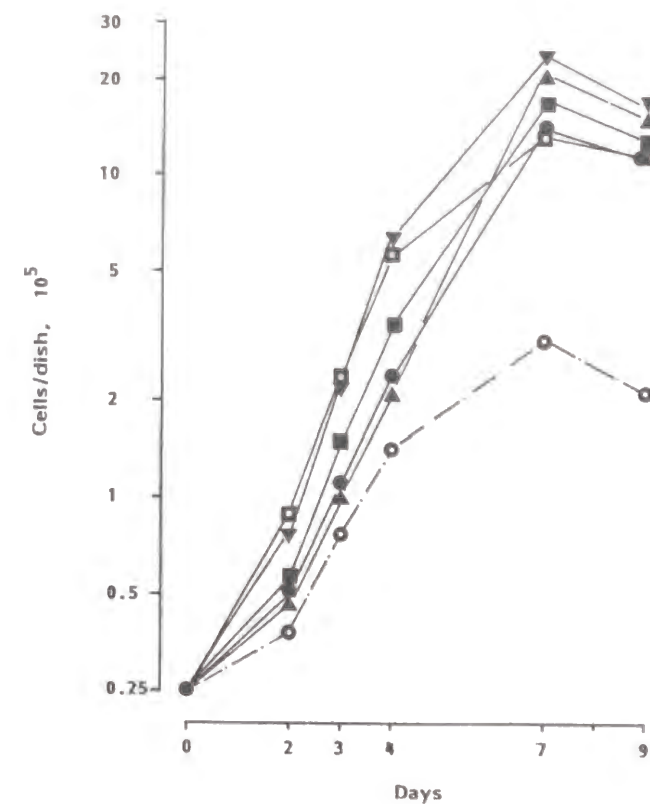
### 1) ヒト FGF-9 発現プラスミドによる A31 細胞のトランスフォーメーション

MuLV-LTR プロモーターの支配下にヒト FGF-9 を発現する発現用プラスミド pRGB12 (Fig.15) をトランスフェクトした細胞 および MuLV-LTR プロモーターの支配下に IL-2 のシグナル配列をつけたヒト FGF-2 を組み込んだ プラスミド pTB1001 (71) をトランスフェクトした細胞は、3 日後から数日間にわたってほとんど全部の細胞にトランスフォーメーション様の形態変化が認められた。徐々にその形態変化は部分的になり、4 週間後にはトランスフェクトした cDNA 量に依存的してフォーカスが形成された (Table 6)。形成されたフォーカスの数は  $5 \mu\text{g/dish}$  の cDNA をトランスフェクトしたときにプラトーに達した。FGF-9 の N 末端側 33 アミノ酸を欠失した FGF-9 分子 (FGF-9 N33、FGF-9 と同様に A31 細胞に対する増殖活性を有する) を発現するプラスミド pRGB25-1 (Fig. 15) を A31 細胞にトランスフェクトした。数日間は一部分の細胞に形態変化が認められたが、この形態変化は徐々に消失し、4 週間後にはフォーカスの形成は全く観察されなかった (Table 6)。コントロールのプラスミド pR-1 をトランスフェクトした場合には形態変化もフォーカス形成も認められなかった。





**Fig. 28** Morphology of FGF-9 transformants. ATG1 (A, G, M), ATG2 (B, H, N), ATG3 (C, I, O), ATG4 (D, J, P), ATG5 (E, K, Q) or A31 (F, L, R) was seeded in 35-mm dishes in 5% CS DMEM with normal mouse IgG (10 µg/ml, G, H, I, J, K, L), MAb 150-59 (10 µg/ml; M, N, O, P, Q, R) or without antibody (A, B, C, D, E, F). Cells were photographed after 4 days culture. The transformants were more elongated, formed a disorderly crisscross pattern, and were retractile and poorly adherent to the dish. The morphology of transformants appeared to revert to normal shape by the addition of MAb 150-59.



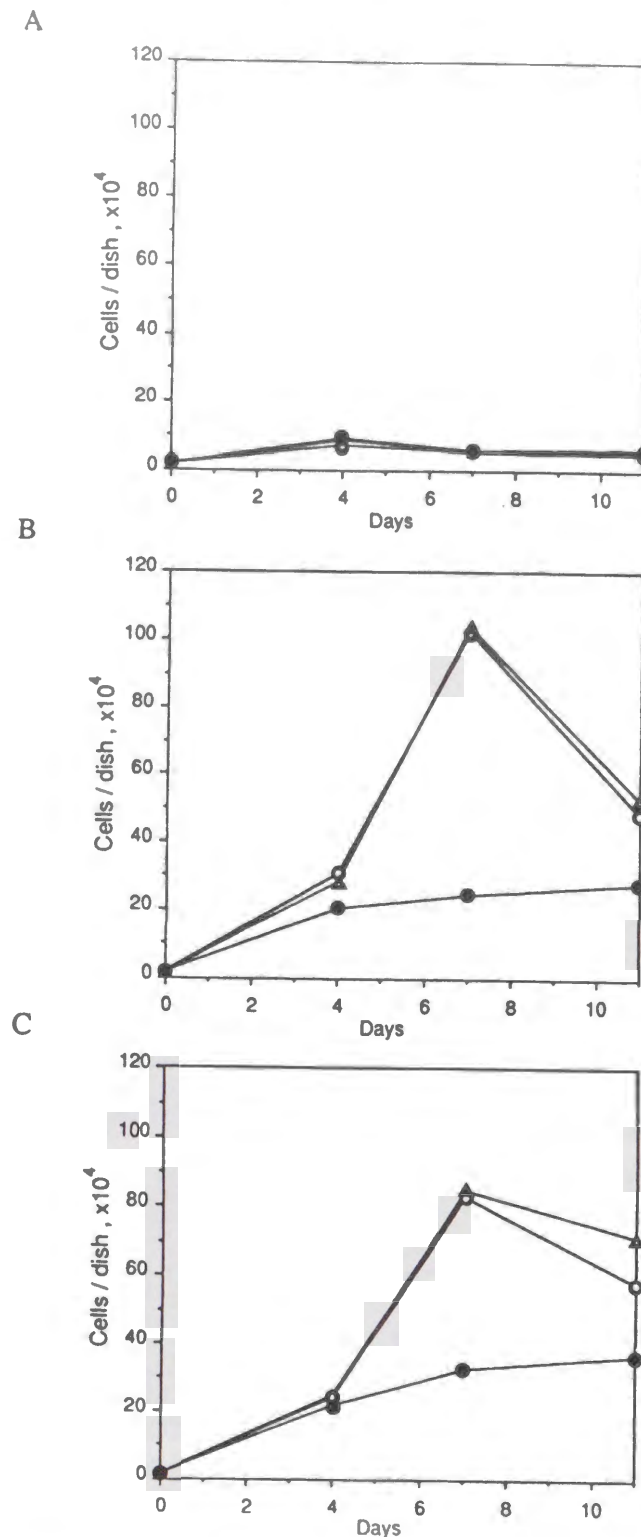
**Fig. 29** Growth curves of transformed cells. Cells ( $2.5 \times 10^4$  cells per 35-mm dish) were plated in 2 ml of DMEM containing 5% CS. Cell numbers were counted at the indicated day, with a Coulter particle counter. ATG1 (closed circles), ATG2 (closed triangles), ATG3 (closed upside down triangles), ATG4 (closed squares), ATG5 (open squares), A31 (open circle), are shown. Each clone grew more rapidly than the parental A31 cells and their saturation densities were 5 to 8 times higher than that of A31 cells.

**Table 6** FOCUS FORMATION BY BALB/c 3T3 A31 CELLS TRANSFECTED WITH THE EXPRESSION PLASMID FOR FGF-9 AND FGF-2

Plasmid (µg/dish)	pR-1	pRGB12	pRGB25-1	pTB1001
0	0	0	0	0
1	0	2	0	1
2	0	3	0	4
5	0	33	0	33
8	0	25	0	36
10	0	23	0	32

Each plasmid DNA was introduced into mouse BALB/c 3T3 clone A31 cells ( $10^5$  cells per 60-mm dish) by the calcium phosphate co-precipitation procedure. The transfected cells were cultured in DMEM supplemented with 5% CS for 4 weeks and then foci were counted after Giemsa staining. Each value is expressed as the mean of 3 experiments. pRGB12 and pTB1001 induced foci depending on the dose of transfected DNA.





**Fig. 30** Growth inhibition of transformed cells by MAb 150-59. Cells ( $2 \times 10^4$  cells per 35-mm dish) were plated in 2 ml of DMEM containing 5% CS with 10  $\mu$ g/ml of normal mouse IgG (open triangles), MAb 150-59 (closed circles) or without antibody (open circles). A; A31, B; ATG3, C; ATG5. The growth of ATG3 and ATG5 was suppressed by the addition of MAb 150-59.

## 2) トランスフォーマントの性質

ヒト FGF-9 を発現するプラスミド pRGB12 をトランスフェクトしてフォーカスを形成したマウス BALB/c 3T3 A31 細胞から、トランスフォーマント (ATG1、ATG2、ATG3、ATG4 および ATG5) をクローニングした。これらの細胞は親株 A31 細胞に比べて著しい形態変化を示した (Fig.28)。得られたトランスフォーマントは親株 A31 細胞に比べて増殖速度が速く (Fig.29、Table 7)、A31 細胞が偏平で 4~5 日できれいな一層の細胞となって増殖を止めるのに対して、立体的な紡錘型で互いに重層しつつ 7~9 日間増殖を続け飽和密度は A31 細胞の 5~8 倍に達するといった、ガン細胞様の形質を示した。これらの性質は pTB1001 を導入して得られたトランスフォーマントでも認められた (71)。このようなトランスフォーム細胞様の形態変化は、A31 細胞に FGF-9 を添加した場合にも認められる (23)。

各トランスフォーマントの培養上清及び細胞抽出液中の FGF-9 活性をラット初代培養グリア細胞に対する DNA 合成誘導能によって測定したところ、各トランスフォーマントの培養上清中に FGF-9 活性が検出された (Table 6)。これに対して、細胞抽出液中には FGF-9 活性はほとんど検出できなかった。FGF-9 産生量が多い細胞株の方が増殖速度が早い傾向が認められた。

## 3) 抗体によるトランスフォーム様形質の復帰

トランスフォーマントの形質変化が分泌された FGF-9 のオートクライン作用によるものかどうかを確認するために FGF-9 に対する抗体を用いて実験を行った。トランスフォーマントを FGF-9 中和抗体である MoAb 150-59 存在下で培養すると、細胞の形態は親株 A31 細胞様に戻った (Fig.28)。このとき、正常マウス IgG はトランスフォーマントの形質変化、増殖速度には影響を与えなかった。また、MoAb 150-59 を添加した細胞の培養上清中からは FGF-9 は検出されなかった (データ不載)。さらに、トランスフォーマントを MoAb 150-59 存在下で培養すると、細胞の増殖速度は低下して細胞の飽和密度が小さくなった (Fig.30)。ここでは ATG3 と ATG5 を用いた結果を示したが、他のトランスフォーマント ATG1、ATG2、ATG4 も MoAb 150-59 の共存により同様の結果が得られた (データ不載)。

## 4) トランスフォーマントの足場依存性

足場非依存性増殖能の獲得は、細胞のガン化と関連性のある *in vitro* での性質のひとつであると考えられている。そこで、得られたトランスフォーマントについて軟寒天培地中での増殖を検討した (Table 7)。親株 A31 細胞はほとんどコロニーを形成しないが、トランスフォーマントはコロニーを形成した。FGF-9 産生量の多いトランスフォーマント (ATG3 細胞、ATG5 細胞) はより大きなコロニーを形成する傾向が認められた。また、抗 FGF-9 中和抗体によってトランスフォーマントのコロニー形成が抑制された (データ不載)。

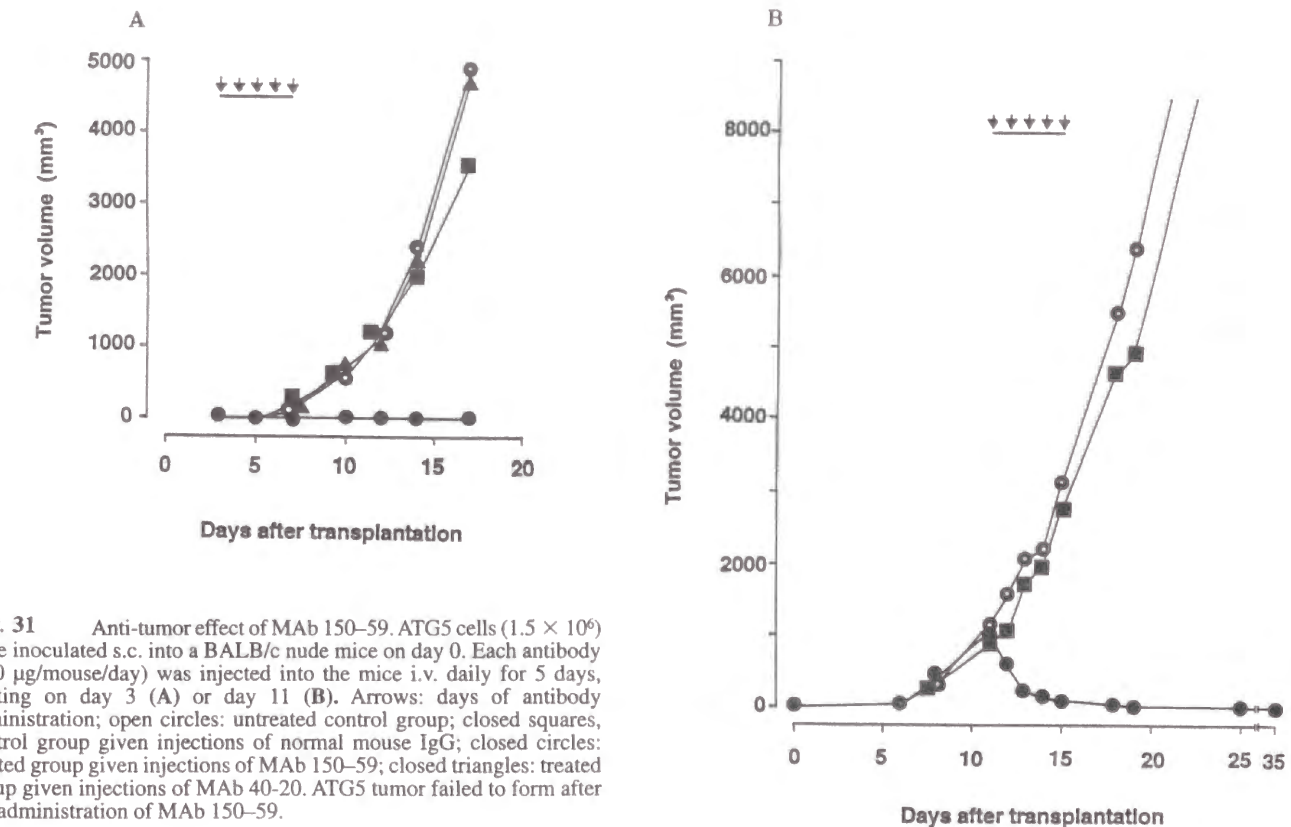
**Table 7** PROPERTIES OF TRANSFORMANTS OBTAINED BY FGF-9 cDNA TRANSFECTION

Cell	Morphological transformation	FGF-9 activity <sup>1</sup> (ng/dish)		Saturation density (10 <sup>5</sup> cells/cm <sup>2</sup> )	Doubling time <sup>2</sup> (hr)	Anchorage dependency <sup>3</sup>
		Medium	Cell extract			
A31	—	0.03	0.03	0.32	24.0	5
ATG1	+	1.8	0.03	1.5	21.5	803
ATG2	+	7.8	0.06	2.2	20.5	1182
ATG3	+	60	0.6	2.5	15.5	1312
ATG4	+	19	0.5	1.8	19.0	681
ATG5	+	78	0.35	1.4	17.0	1519

<sup>1</sup>Cells (1 × 10<sup>5</sup>) were seeded in a 35-mm tissue culture dish and cultured for 3 days in 2 ml of DMEM containing 5% CS. The medium was collected to determine FGF-9 activity. The cells were scraped, washed twice with PBS, suspended in PBS, and sonicated for 90 sec. After centrifugation for 15 min, the supernatant was assayed for FGF-9 activity. <sup>2</sup>Cells were seeded in duplicate at 2.5 × 10<sup>4</sup> cells per 35-mm tissue culture dish with 2 ml of DMEM containing 5% CS. The cell number was counted every 2 or 3 days. <sup>3</sup>DMEM containing 10% FCS and 0.5% agar were added to 35-mm tissue culture dish. Cells (1 × 10<sup>4</sup>) were suspended in DMEM containing 10% FCS and 0.3% agar, and plated. These were cultured for 2 weeks and viable colonies were counted.

#### 5) *In vivo*におけるトランスフォーマントのガン形成

得られたトランスフォーマントの *in vivo* でのガン形成能を調べた。ヌードマウスに ATG5 細胞を接種したところ、ガンが形成された (Fig.31)。他のトランスフォーマントも同様にヌードマウスに於いてガンを形成した (データ不載)。なお、親株 A31細胞はガンを形成しなかった。ATG5 細胞を接種して3日後から5日間 FGF-9 に対する中和抗体である MoAb 150-59 を i.v. 投与したところ、ガンの形成が全く認められなかった (Fig. 31A)。FGF-9 を認識するが FGF-9 に対して中和活性のない MoAb 40-20、あるいは正常マウスの IgG はガン形成には影響を与えなかったことから、MoAb 150-59 の抗ガン作用が非特異的な活性でないことが示された。さらに、ATG5 細胞を接種し11日後のヌードマウスに、MoAb 150-59 を投与した。この時点でガンは約 1000mm<sup>3</sup> にまで大きくなっていたが、MoAb 150-59 投与によってガン形成は著しく阻害され、ついにはガンは消失した。抗体投与終了後、少なくとも2週間はガンの再形成は認められなかった (Fig.31B)。

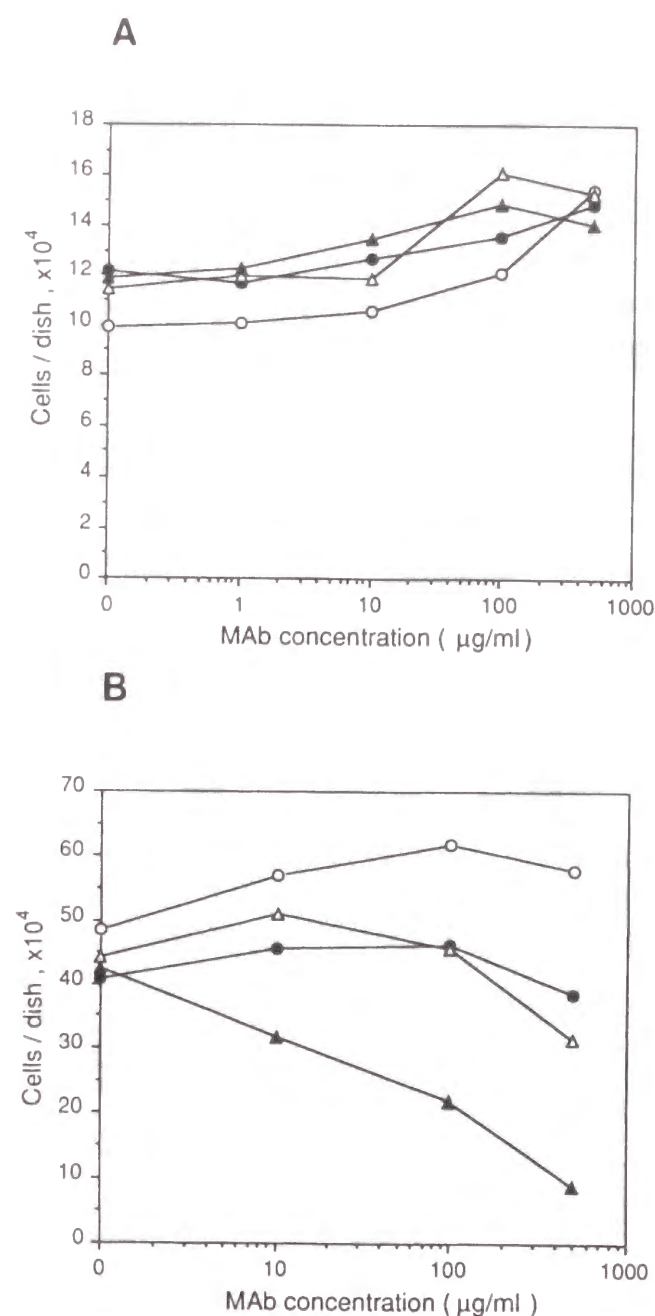


**Fig. 31** Anti-tumor effect of MAb 150-59. ATG5 cells (1.5 × 10<sup>6</sup>) were inoculated s.c. into a BALB/c nude mice on day 0. Each antibody (200 µg/mouse/day) was injected into the mice i.v. daily for 5 days, starting on day 3 (A) or day 11 (B). Arrows: days of antibody administration; open circles: untreated control group; closed squares, control group given injections of normal mouse IgG; closed circles: treated group given injections of MAb 150-59; closed triangles: treated group given injections of MAb 40-20. ATG5 tumor failed to form after the administration of MAb 150-59.

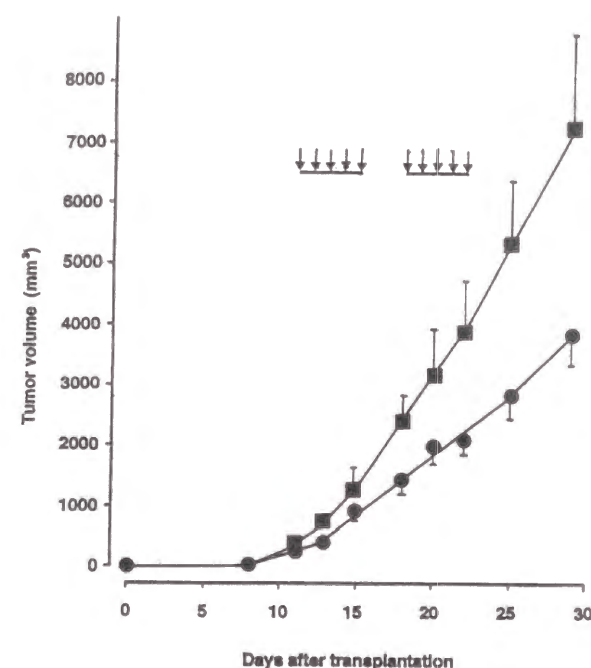
#### 6) NMC-G1 および AZ-521 の増殖に対する MoAb 150-59 の影響

種々のヒトガン細胞株について FGF-9 の分泌の有無を調べた。ヒトグリオーマ細胞株 NMC-G1 とヒト胃ガン細胞株 AZ-521 が FGF-9 を分泌していた (それぞれ 740pg/ml および 460pg/ml) (123、第二編 Table 1)。これらの細胞株が自らが分泌した FGF-9 によってオートクラインで増殖しているのかどうかを検討するために、MoAb 150-59 のこれらの細胞の増殖への影響を検討した。NMC-G1 の増殖はヘパリンの共存の有無にかかわらず MoAb 150-59 によって抑制されなかった (Fig.32A)。これに対して、MoAb 150-59 によって AZ-521 の増殖は阻害された (Fig.32B)。この抑制作用はヘパリン共存下では増強され、抗体の濃度に依存的な抑制作用が認められた。ヘパリンは、一部の FGF ファミリーメンバーの増殖促進作用を増強させる活性を有することが知られているが、ヘパリンそのものには増殖促進作用はない。このとき、細胞の形態には変化は認められなかった。なお、中和活性のない抗 FGF-9 抗体 MoAb 40-20 は AZ-521 の増殖および形態変化には影響を与えなかった。MoAb 150-59 の連続投与によってヌードマウスでの AZ-521 のガン形成速度は遅くなった (コントロールの 54%) (Fig.33)。これらの結果から、分泌された FGF-9 によるオートクライン増殖が AZ-521 のガン化の一因となっている可能性が示された。





**Fig. 32** Effect of MAb 150-59 on the growth of NMC-G1 and AZ-521 cells. NMC-G1 (A) or AZ-521 (B) ( $2 \times 10^4$  cells) were plated on 24-well culture plate in DMEM containing 5% FCS. Cells were cultured with MAb 150-59 (triangles) or MAb 40-20 (circles), and with (20  $\mu$ g/ml, closed symbols) or without (open symbols) heparin. After 7 days, cell numbers were counted with a Coulter particle counter. The proliferation of AZ-521 was inhibited by the addition of MAb 150-59 with heparin.



**Fig. 33** Anti-tumor effect of MAb 150-59 on AZ-521 tumor growth. Seven week-old, female, BALB/c nude mice ( $n = 6$ ) were each inoculated s.c. with  $3 \times 10^6$  AZ-521 cells cultured *in vitro*. Each antibody (200  $\mu$ g/mouse/day) was injected i.v. daily for 5 days starting on day 11, and again injected for 5 days starting on day 18. Tumor size was measured with calipers on the day indicated on the abscissa. Arrows: days of antibody administration; solid circles: treated group given injections of MAb 150-59; solid squares: control group given non-immune mouse IgG. The growth of AZ-521 tumor was retarded by the administration of MAb 150-59.

### 3. 考察

ヒト FGF-9 を発現するプラスミド pRGB12 をトランスフェクトしたマウス BALB/c 3T3 A31 細胞は、トランスフェクションの3日後から数日間にわたってほとんど全部の細胞がガン化細胞様の形態変化を示した。このような形態変化は、FGF-9 を A31 細胞に作用させた時にも観察された (23)。トランスフェクション後の数日間は、FGF-9 が一過性に発現して分泌されたため A31 細胞が形態変化を起こしたと考えられる。その後、形態変化を示す細胞は徐々に消失して部分的になり、4週間後にはフォーカスの形成が認められた。pRGB12 をトランスフェクトして細胞外に分泌される FGF-9 を発現させた場合にはフォーカス形成が認められたが、pRGB25-1 をトランスフェクトして細胞外に分泌されない FGF-9 N33 (第三編第二章) を発現させた場合にはフォーカス形成が認められなかった。このことから、分泌された FGF-9 によってフォーカスの形成が惹起されたと考えられる。

得られたトランスフォーマント (ATG1、ATG2、ATG3、ATG4、ATG5) は、典型的なガン化細胞様の形質 (ガン化細胞様の形態、増殖速度の増加、接触阻止能の欠如、足場非依存性の増殖、ヌードマウスでのガン形成) を示していた。PDGF (127)、TGF- $\alpha$  (128)、EGF (129) や FGF-2 (62) 等の細胞増殖因子はオートクライン機構によって細胞のガン化に関与していると報告されている。その多くは、増殖因子がそのレセプターに細胞外から作用すると考えられている。得られたトランスフォーマントは培養上清中に FGF-9 を分泌していたが、ガン化細胞様の形質はその分泌量に相関する傾向が認められた。FGF-9 の中和抗体である MoAb 150-59 の添加によってトランスフォームした細胞のガン化細胞様の形質が親株 A31 細胞に近い形に戻った。さらに、トランスフォーマント ATG5 細胞をヌードマウスに接種して作成した担ガンマウスに、MoAb 150-59 を投与したところ、ガン形成は著しく阻害され消失した。これらの結果から、MoAb 150-59 に抗ガン活性があることが示された。シグナル配列を付加した FGF-2 cDNA を導入して作製したトランスフォーマントが形成するガンの増殖は、抗 FGF-2 中和モノクローナル抗体によって抑制された。ところが、*in vitro* ではこの抗体はトランスフォーマントの増殖を抑制しなかったことから、中和抗体の抗ガン作用は、FGF-2 の血管新生作用の抑制によるものであると考えられる (133)。一方、FGF-9 には血管内皮細胞の増殖促進活性は認められなかったことから (第一編、23,56)、FGF-9 の中和抗体の抗ガン作用は血管新生抑制作用によるものではないと考えられる。これらの結果から、FGF-9 のトランスフォーマントの形質変化は、生合成されて分泌された FGF-9 が直接その細胞表面のレセプターに作用して引き起こされたと考えられる。これら FGF-9 トランスフォーマントは、典型的な オートクライン トランスフォーメーション のモデルと思われる。

このような FGF-9 のオートクライン分泌が細胞のガン化の一因となっている例を種々のガン細胞で検索した。FGF-9 に対する EIA 系を用いて種々のガン細胞株からの FGF-9 の分泌について検討した結果、ヒト胃ガン細胞株 AZ-521 が FGF-9 を分泌していることが明らかになった (第二編 Table 1、123)。*In vitro* で MoAb 150-59 はヘパリン存在下で AZ-521 の増殖を抑制した。さらに、MoAb 150-59 はヌードマウスに AZ-521 を移植して形成されたガンの増殖を遅らせた。これらの結果から、少なくとも AZ-521 の場合には

自発的な FGF-9 の分泌が細胞のガン化能の獲得に一部 寄与している可能性があると考えられる。FGF-9 が ガン化に関与しているようなヒトのガンの例は他にもあると推測される。

以上、FGF-9 のオートクライン分泌が細胞のガン化の一因となっている可能性について示した。これまでに報告されている FGF ファミリー のメンバーはいずれもガン原性を持ち (2-5,7-11,13)、FGF-9 にも同様の活性があると考えられる。

## 第三編 小括

FGF-9 の性状 および 生物活性についての検討を行い、以下の知見を得た。

1. 成熟ラットでは、FGF-9 遺伝子はノザンブロット解析により主要臓器のうち脳と腎臓に、FGF-9 蛋白は FGF-9 に対する高感度 EIA 系により小脳に、それぞれ限局的に発現していることが明らかになった。

2. FGF-9 は NMC-G1 の培養上清から精製されたこと、その N 末端側のアミノ酸配列に典型的なシグナル配列を持たないこと、FGF-9 cDNA を COS7 細胞に導入発現させたところ FGF-9 活性が培養上清に検出されたこと、N 末端アミノ酸を 33 個削った FGF-9 N33 を COS7 細胞に導入発現させたところ FGF-9 N33 は細胞外には分泌されず糖鎖が付加していないと思われる大きさで細胞内に存在したことから、FGF-9 の分泌には N 末端のアミノ酸が必要であることが示唆される。

3. FGF-9 の造血系への作用を *in vitro* および *in vivo* で調べ、次のような結果を得た。

- 1) FGF-9 が *in vitro* で巨核球 コロニー刺激因子 (Megakaryocyte Colony-stimulating Factor ; MK-CSF) 様活性を持つことを見い出した。
- 2) BALB/c マウスに組換えヒト FGF-9 を 2 週間連日皮下投与したところ、投与開始後 10 日から 12 日目にかけて一過性に投与量に依存した末梢血中の血小板数の上昇が認められた。
- 3) i) マウス骨髄中の巨核球の核 DNA 量 (プロイディ) は通常 16 N 巨核球が最も多い分布をとるが、FGF-9 投与によって投与後 3 日目に 2 N 巨核球の割合が最も多い分布に変化したこと、ii) 投与後 6 日目に巨核球系前駆細胞の割合が最も増加していたこと、iii) FGF-9 投与マウスの骨髄中の巨核球数が増加していたことから、FGF-9 は *in vivo* で巨核球系前駆細胞を増殖させることにより、末梢血中の血小板を増加させたことが明らかになった。

これらの *in vivo* における活性は、他の FGF ファミリーメンバーに関して従来報告されていなかった性質である。



4. 1) FGF-9 の cDNA を A31 細胞に導入して得られたトランスフォーマントはガン化細胞様の形質（ガン化細胞様の形態、増殖速度の増加、接触阻止能の欠如、足場非依存性増殖、ヌードマウスでのガン形成）を示した。これらのガン化細胞様の形質が FGF-9 の中和抗体 MoAb 150-59 により抑制されたことから、FGF-9 がオートクライン機序によって細胞をガン化させたことが示唆された。

2) FGF-9 を分泌しているヒト胃ガン細胞株 AZ-521 の増殖は *in vitro* および *in vivo* で FGF-9 の中和抗体 MoAb 150-59 によって抑制されたことから、FGF-9 の分泌が AZ-521 のガン化に関与している可能性が示された。

これらの結果から、FGF ファミリーメンバーと同様に FGF-9 にもガン原性があると考えられる。

## 総 括

著者らは、FGF-9 の遺伝子の同定とその生物活性に関する研究を行い、以下の新知見を得た。

1. GAF (Glia-Activating Factor) をコードする cDNA をクローン化した。得られたアミノ酸配列の相同性の検索から、GAF は線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast Growth Factor ; FGF) ファミリーに属することが示唆され、9 番目の新しいファミリーメンバーとして FGF-9 と命名した。

2. 大腸菌で大量に産生させた FGF-9 を用いてヒト FGF-9 に対するモノクローナル抗体を 4 種類作製した。これらのうち、MoAb 150-59 は FGF-9 による BALB/c 3T3 A31 細胞の増殖に対する中和活性を示した。

FGF-9 に対する高感度 EIA 系を、得られたモノクローナル抗体 MoAb13-3 および MoAb150-59 を用いて構築した（検出限界 3 pg/well）。

3. FGF-9 の性状および生物活性について以下の検討を行った。

1) 成熟ラットでは、FGF-9 遺伝子は脳と腎臓に、FGF-9 蛋白は小脳に、それぞれ限局的に発現していた。

2) FGF-9 の分泌には N 末端 33 個のアミノ酸が必要であることが示唆された。

3) FGF-9 が血小板産生促進活性を有することを見出した。FGF-9 皮下投与マウスの骨髄中の巨核球の核 DNA 量（プロイディ）の分布の推移 および 巨核球系前駆細胞の挙動の解析から、FGF-9 の血小板産生促進活性は巨核球系前駆細胞を増殖させることによるものであった。

4) FGF-9 の cDNA を A31 細胞に導入して得られたトランスフォーマント および ヒト胃ガン細胞株 AZ-521 において、分泌された FGF-9 が細胞のガン化に関与している可能性が示された。

以上、著者らは GAF の cDNA をクローニングし、GAF を FGF ファミリーに属する新しいメンバーであることを見だし、その発現部位、分泌機構に関して検討を加えた。さらにその生物活性として、他の FGF ファミリーメンバーと同様のガン原性に加えて、従来報告のなかった造血系細胞への作用ならびに *in vivo* での血小板産生促進作用を発見した。これらの成績は、様々な生理的役割を担う FGF に関する重要な新知見であり、今後の FGF 研究の進展に大きく寄与するものと考えられる。

## 論文目録

本研究の内容は、以下の論文に発表した。

1. M.Miyamoto, K.Naruo, C.Seko, S.Matsumoto, T.Konodo and T.Kurokawa : Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding ninth member of the fibroblast growth factor family, which has a unique secretion property. (1993) *Mol.Cell.Biol.*, 13, 4251-4259.  
[引用文献 63]
2. S.M.Yoshitomi, K.Kuroshima, C.Seko, K.Naruo, A.Shino, T.Kondo and T.Kurokawa : Stimulation of thrombopoiesis in mice by fibroblast growth factor 9. (1995) *Growth Factors*, 12, 179-190.  
[引用文献 65]
3. S.M.Yoshitomi, K.Kuroshima, C.Nomura, J.Habashita and T.Kurokawa : Construction of a sensitive enzyme immuno-assay for human fibroblast growth factor 9. (1996) *HYBRIDOMA* 15, 299-305.  
[引用文献 123]
4. S.M.Yoshitomi, J.Habashita, C.Nomura, K.Kuroshima and T.Kurokawa : Autocrine transformation by fibroblast growth factor 9 (FGF-9) and its possible participation in human oncogenesis. (1997) *Int.J.Cancer.*, 71,442-450.  
[引用文献 55]

## 謝 辞

本論文の発表の機会を与えて頂き、また、本論文作製にあたり御懇意懇篤なご指導を賜りました 京都大学大学院薬学研究科 佐藤公道教授 に対しまして、ここに謹んで感謝の意を表します。

本研究は、武田薬品工業株式会社 黒川勉博士 のご指導ご鞭撻の下に遂行されたものであり、心より感謝いたします。さらに、本研究に多大なご協力をいただきました、武田薬品工業株式会社 志野晟生博士、佐々田玲子博士、成尾憲一博士、黒嶋健一氏、野村智佐子氏、巾下純子氏、神戸大学 宮本昌明博士 に厚く御礼申し上げます。また、種々の FGF を恵与してくださいました 武田薬品工業株式会社 五十嵐貢一博士、福田常彦博士、石丸かおり氏 に、FGF-9 の組織学的解析にご協力いただきました 同社 桜川賢治氏、平井加津子氏 に深謝いたします。さらに、cDNA ライブラリー を恵与していただきました 東京大学教授 岡山博人博士、神戸大学教授 小野功貴博士 に、NMC-G1 細胞を恵与していただきました 国立医療センター 近藤達也博士 に厚く御礼申し上げます。また、本論文に関して格別のご配慮を賜りました、武田薬品工業株式会社 寺尾泰次博士、西村紀博士、朝日知博士 に深く感謝いたします。

終わりに、武田薬品工業株式会社 藤野政彦博士 に、本研究の機会を与えていただき、ご鞭撻を賜りましたことを深謝いたします。



## 引用文献

- 1) Gospodarowicz, D. (1974) *Nature (London)*, **249**, 123-127.
- 2) Jaye, M., Howk, R., Burgess, W., Ricca, G.A., Chiu, I.M., Ravera, M.W., O'Brien, S.J., Modi, W.S., Maciag, T. and Drohan, W.M. (1986) *Science*, **233**, 543-545.
- 3) Abraham, J.A., Whang J.L., Tumolo, A., Mergia, A., Friedman, J., Gospodarowicz, D. and Fiddes, J.C. (1986) *EMBOJ.*, **5**, 2523-2528.
- 4) Kurokawa, T., Sasada, R., Iwane, M. and Igarashi, K. (1987) *FEBS Lett.*, **213**, 186-194.
- 5) Moor, R., Casey, G., Brookes, S., Dixon, M., Peters, G. and Dickson, C. (1986) *EMBOJ.*, **5**, 919-924.
- 6) Smith, R., Peters, G. and Dickson, C. (1988) *EMBOJ.*, **7**, 1013-1022.
- 7) Dellibovi, P., Curatora, A.M., Kem, F.G., Greco, A., Ittmann, M. and Basillico, C. (1987) *Cell*, **50**, 729-737.
- 8) Taira, M., Yoshida, T., Miyagawa, K., Sakamoto, H., Terada, M. and Sugimura, T. (1987) *Proc. Acad. Sci. USA*, **84**, 2980-2984.
- 9) Yoshida, T., Miyagawa, K., Odagiri, H., Sakamoto, H., Little, P.F.R., Terada M. and Sugimura, T. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7305-7309.
- 10) Sakamoto, H., Mori, H., Taira, M., Yoshida, T., Matsukaea, S., Shimizu, K., Sekiguchi, M., Terada, M. and Sugimura, T. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3997-4001.
- 11) Zhan, X., Bates, B., Hu, X. and Goldfarb, M. (1988) *Mol. Cell Biol.* **8**, 3487-3495.
- 12) Iida, S., Yoshida, T., Naito, K., Sakamoto, H., Katoh, O., Hirohashi, S., Sato, Y., Onda, M., Sugimura, T. and Terada, M. (1992) *Oncogene*, **7**, 303-309.
- 13) Marics, J., Adelaide, J., Raybaud, F., Mattei, M.G., Coulier, F., Planche, J., Lapeyriere, O. and Birnbaum, D. (1989) *Oncogene*, **4**, 335-340.
- 14) Finch, P.W., Rubbin, J.S., Miki, T., Ron, D. and Aaronson, S. A. (1989) *Science*, **245**, 725-755.
- 15) Rubin, J.S., Osawa, H., Finch, P.W., Taylor, W.G., Rudikoff, S. and Aaronson, A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 802-806.
- 16) Tanaka, A., Miyamoto, K., Minamino, N., Takeda, Sato, M., Matsuo, H. and Matsumoto, K. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8928-8932.
- 17) Hattori, Y., Yamasaki, M., Konishi, M. and Itoh, N. (1997) *Mol. Brain. Res.*, **47**, 139-146.
- 18) Tamasaki, M., Miyake, A., Tagashira, S. and Itoh, N. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 15918-15921.
- 19) Smallwood, P.M., Munoz-Senjuan I, Tong, P., Macke, J.P., Hendry, S.H.C., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Nathans, J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9850-9857.
- 20) Coulier, F., Pontarotti, P., Roubin, R., Hartung, H., Goldfarb, M. and Birnbaum, D. (1997) *J. Mol. Evol.*, **44**, 43-56.
- 21) Verdier, A. -S., Mattei, M.-G., Lovec, H., Hartung, H., Goldfaub, M., Birnbaum, D. and Coulier, F. (1997) *Genomics*, **40**, 151-154.

- 22) Goldfarb, M. Deed, R., MacAllan, D., Walther, W., Dickson, C. and Peters, G. (1991) *Oncogene*, **6**, 65-71.
- 23) Naruo, K., Seko, C., Kuroshima, K., Matsutani, E., Sasada, R., Kondo, T. and Kurokawa, T. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 2857-2864.
- 24) Miyagawa, K., Sakamoto, H., Yoshida, T., Yamashita, Y., Mitsui, Y., Furusawa, M., Maeda, S., Takaku, F., Sugimura, T. and Terada, T. (1988) *Oncogene*, **3**, 383-389.
- 25) Yoshida, T., Muramatsu, H., Muramatsu, T., Sakamoto, H., Katoh, O., Sugimura, T. and Terada, M. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 618-625.
- 26) Yoshida, T., Tsutsumi, M., Sakamoto, H., Miyagawa, K., Teshima, S., Sugimura, T. and Terada, M. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**, 1324-1329.
- 27) Burgess, W.H. and Maciag, T. (1989) *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 575-606.
- 28) Seed, B. and Aruffo, A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 659-667.
- 29) Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)*, **227**, 680-685.
- 30) Sasada, R., Onda, H. and Igarashi, K. (1987) *Cell. Struct. Funct.*, **12**, 205-217.
- 31) Shaw, G. and Kamen, R. (1986) *Cell*, **46**, 659-667.
- 32) Lauder, J. and McCarthy, K. (1986) in *Astrocytes (Fedoroff, S. and Vernadakis, A., eds)* Vol. 2, pp.295-314, Academic Press, New York.
- 33) Turner, D. L. and Cepko, C. L. (1987) *Nature*, **328**, 131-136.
- 34) Galileo, D.S., Gray, G.E., Owens, G.C., Majors, J. and Sanes J.R. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 458-462.
- 35) Lillien, L.E. and Raff, M.C. (1990) *Neuron*, **5**, 111-119.
- 36) Raff, M.C., Lillien, L.E., Richardson, W. D., Burne, J.F., and Noble, M. D. (1988) *Nature*, **333**, 562-565.
- 37) Griffin, W.S.T., Stanley, L.C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, J.L., White, C.L., III and Araoz, C. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7611-7615.
- 38) Manthorpe, M., Rugde, J.S. and Varon, S. (1986) in *Astrocytes (Fedoroff, S. and Vernadakis, A., eds)* Vol. 2, pp.315-376, Academic Press, New York.
- 39) Libermann, T.A., Friesel, R., Jaye, M., Lyall, R.M., Westmark, B., Drohan, W., Schmidt, A., Maciag, T. and Schlessinger, J. (1987) *EMBO J.*, **6**, 1627-1632.
- 40) Pruss, R.M., Bartlett, P.F., Gavrilovic, J., Lisak, R.P. and Rattray, S. (1986) *Dev. Brain Res.*, **2**, 19-35.
- 41) Kniss, D.A. and Burry, R. W. (1988) *Brain Res.*, **439**, 281-288.
- 42) Eccleston, P.A. and Silberberg, D.H. (1985) *Dev. Brain Res.*, **21**, 315-318.
- 43) Simpson, D.L., Morrison, R., de Vellis, J. and Herschman, H.R. (1982) *J. Neurosci. Res.*, **8**, 453-462.
- 44) Heldin, C.H., Westeson, A. and Westmark, B. (1977) *Exp. Cell Res.*, **109**, 429-437.
- 45) Besnard, F., Perraud, F., Sensenbrenner, M. and Labourdette, G. (1977) *Neurosci. Lett.*, **73**, 287-292.
- 46) Kimura, H., Fisher, W. H. and Schubert, D. (1990) *Nature*, **348**, 257-260.
- 47) Giulian, D. and Lachman, L.B. (1985) *Science*, **228**, 497-499.
- 48) Benveniste, E.N. and Merrill, J.E. (1986) *Nature*, **321**, 610-613.

- 49) MacCumber, M.W., Ross, C.A. and Snyder, S.H. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2359-2363.
- 50) Lemke, G.E. and Brookes, J.P. (1984) *J. Neurosci.*, **4**, 75-83.
- 51) Kato, T., Fukui, Y., Turiff, D.E., Nagasawa, S., Lim, R., Amason, B.G.W. and Tanaka, R. (1981) *Brain Res.*, **212**, 393-402.
- 52) Kato, T., Ito, J., Ishikawa, K., Mizutani, K., Tanaka, R., Wakabayashi, S., Horiuchi, I. Kato, K. and Kamo-Tanaka, K. (1984) *Brain Res.*, **301**, 83-93.
- 53) Giulian, D., Allen, R.L., Baker, T.J. and Tomozawa, Y. (1986) *J. Cell Biol.*, **8**, 588-594.
- 54) Baird, A., and Klagsbrun. (1991) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **638**, xiii-xvi.
- 55) Yoshitomi, S., Habashita, J., Nomura, C., Kuroshima, K. and Kurokawa, T. (1997) *Int. J. Cancer*, **71**, 442-450.
- 56) Seko, C., Naruo, K., Kuroshima, K., Miyamoto, M., Kondo, T. and Kurokawa, T. to be submitted.
- 57) Watanabe, T., Seno, M., Sasada, R. and Igarashi, K. (1990) *Mol. Endocrinol.*, **4**, 569-579.
- 58) Iwane, M., Kurokawa, T., Sasada, R., Seno, M., Nakagawa, S. and Igarashi, K. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **146**, 470-477.
- 59) Shintani, A., Watanabe, T., Kuroshima, K., Ichimori, Y., Kurokawa, T., Igarashi, K. and Sasada, R. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 1500-1507.
- 60) Y. Ichimori, T. Kurokawa, S. Honda, N. Suzuki, M. Wakimasu and K. Tsukamoto (1985) *J. Immunol. Methods*, **80**, 55-66.
- 61) L. Bjork and Kronvall, G. (1984) *J. Immunol.*, **33**, 969-974.
- 62) Sasada, R., Kurokawa, T., Iwane, M. and Igarashi, K. (1988) *Mol. Cell Biol.*, **8**, 588-594.
- 63) Miyamoto, M., Naruo, K., Seko, C., Matsumoto, S., Kondo, T. and Kurokawa, T. (1993) *Mol. Cell Biol.*, **13**, 4251-4259.
- 64) H. Watanabe, A. Hori, M. Seno, Y. Kozai, K. Igarashi, Y. Ichimori and K. Kondo (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**, 229-235.
- 65) S. Yoshitomi, C. Seko, K. Kuroshima, K. Naruo, A. Shino, T. Kondo and T. Kurokawa (1995) *Growth Factors*, **12**, 179-190.
- 66) Kakunaga, T. and Crow, L.D. (1980) *Science*, **209**, 505-507.
- 67) Rogeli, S., Weinberg, R.A., Fanning, P. and Klagsbrun, M. (1988) *Nature*, **331**, 173-175.
- 68) Acland, P., Dixon, N., Peters, G. and Dickson, C. (1990) *Nature (London)*, **343**, 663-665.
- 69) Florkiewicz, R.Z. and Sommer, A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3978-3981.
- 70) Prats, H., Kaghad, M., Prats, A.C., Klagsbrun, M., Lelias, J.M., Liazum, P., Chalon, P., Tauber, J.P., Amalric, F., Smith, J.A. and Caput, D. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1836-1840.
- 71) Sasada, R., Seno, M., Watanabe, T. and Igarashi, K. (1991) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **638**, 149-160.
- 72) Kosak, M. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 19867-19870.
- 73) Tagashira, S., Ozaki, K., Ohia, M. and Itoh, N. (1995) *Mol. Brain Res.*, **30**, 233-241.
- 74) Davis, B.D. and Tai, P.-C. (1980) *Nature (London)*, **283**, 433-437.



- 75) Odell Jr, T. T. and Kniseley, R.M. (1962) *Prog. Hematol*, **13**, 203.
- 76) Odell Jr, T.T., Murphy, J.R. and Jackson, C.W. (1976) *Blood*, **48**, 765-775.
- 77) Levin, J. and Evatt, B. L. (1979) *Blood*, **5**, 105.
- 78) Ebbe, S., Yee, T., Carpenter, D. and Phalen, E. (1988) *Exp. Hematol*, **16**, 55.
- 79) Metcalf, D., McDonald, H.R., Odartchenko, N. and Sordat, B. (1975) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **72**, 1744-1748.
- 80) Williams, N., Eger, R.R., Jackson, H.M. and Nelson, P.J. (1982) *J. Cell. Physiol.*, **110**, 101-104.
- 81) Hoffman, R. (1989) *Blood*, **74**, 1196-1212.
- 82) Teramura, M and Mizoguchi, H. (1990) *Int. J. Cell Cloning*, **8**, 245-252.
- 83) Williams, D.E., Krumweih, D. and Seiler, F. (1991) *Hematol. Oncol.*, May 1991.
- 84) Burstein, S.A., Mei, R., Henthorn, J., Friese, P. and Turner, K. (1990) *Blood*, **76**, (Suppl. 1): 450a (abstract).
- 85) Paul, S.R., Barnett, F., Calveti, J.A., Kelleher, K., Wood, C.R., O'Hara Jr, R.M., Leary, A.C., Sibley, B., Clark, S.C., Williams, D.A. and Yang, Y.-C. (1990) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 7512-7516.
- 86) Mizoguchi, H., Fujiwara, Y. and Sasaki, R. (1986) *Megakaryocyte Development and Function*, (edited by Levin, R.F., Williams, J., Levin, J. and Evatt, B.L.), Alan Liss, Inc., New York, **111**.
- 87) Metcalf, D., Hilton, D. and Nicola, N.A. (1991) *Blood*, **77**, 2150-2153.
- 88) Nkai, S., Aihara, K. and Hirai, Y. (1989) *Life Sciences*, **45**, 585-591.
- 89) Tewari, A., Buhles, W.C. and Starnes Jr, H. F. (1990) *Lancet*, **336**, 712-714.
- 90) Donahue, R.E., Seehra, J., Metzger, M., Lefebvre, D., Rock, B., Carbone, S., Nathan, D. G., Garnick, M., Sehgal, P.K., Laston, D., La Vallie, E., McCoy, J., Schendel, P.F., Norton, C. Turner, K., Yang, Y. and Clark, S.C. (1988) *Science*, **241**, 1820-1823.
- 91) Ganser, A., Lindermann, A., Seipelt, G., Ottmann, O.G., Eder, M., Falk, S., Hermann, F., Kaltwasser, J.P., Meusers, P., Klausmann, M., Frisch, J., Schulz, G., Mertelsmann, R. and Hoelzer, D. (1990) *Blood*, **76**, 1287-1292.
- 92) Ganser, A., Lindermann, A., Seipelt, G., Ottmann, O.G., Hermann, F., Eder, M., Frisch, J., Schulz, G., Mertelsmann, R. and Hoelzer, D. (1990) *Blood*, **76**, 666-676.
- 93) Ishibashi, T., Kimura, H., Shikama, Y., Uchida, T., Kariyone, S., Hirano, T., Kishimoto, T., Takaku, F. and Akiyama, Y. (1989) *Blood*, **74**, 1241-1244.
- 94) Asano, S., Okano, A., Ozawa, K., Nakahata, T., Ishibashi, T., Koike, K., Kimura, H., Tanioka, Y., Shibuya, A., Hirano, T., Kishimoto, T., Takaku, F. and Akiyama, Y. (1990) *Blood*, **75**, 1602-1605.
- 95) Hill, R.J., Warren M.K. and Levin, J. (1990) *J. Clin. Invest.*, **85**, 1242-1247.
- 96) Nagasawa, T., Orita, T., Matsushita, J., Tsuchiya, M., Neichi, T., Imazeki, I., Imai, N., Ochi, N., Kanma, H. and Abe, T. (1990) *FEBS Lett.*, **260**, 176-178.
- 97) Stahl, C. P., Zucker-Franklin, D., Evatt, B.L. and Winton, E.F. (1991) *Blood*, **78**, 1467-1475.
- 98) Goldman, S., Loebelenz, J., McCarthy, K., Hayes, L., Neben, T., Stoudemire, J.B. and Schaub, R.G. (1991) *Blood*, **78**, (Suppl. 1), 132a (abstract).
- 99) Kaushansky, K., Lok, S., Holly, R.D., Broudy, V.C., Lin, N., Bailey, M.C., Forstrom, J.W., Buddle, M.M., Oort, P.J., Hagen, F. S., Roth, G.J., Papayannopoulou, T. and Foster, D.C. (1994) *Nature*, **369**, 568-571.
- 100) Lok, S., Kaushansky, K., Holly, R.D., Kuijper, J.L., Lofton-Day, C.E., Oort, P.J., Grant, F.L., Heipel, M.D., Burkhead, S. K., Kramer, J.M., Bell, L.A., Sprecher, C.A., Blumberg, H., Johnson, R., Prunkard, D., Ching, A.F. T., Mathewes, S. L., Bailey, M.C., Forstrom, J.W., Buddle, M.M., Osborn S.G., Evans, S. J., Sheppard, P.O., Presnell, S.R., O'hara, P.J., Hagen, F.S., Roth, G. J. and Foster, D.C. (1994) *Nature*, **369**, 565-568.
- 101) Sauvage, F.J., Hass, P.E., Spencer, S.D., Malloy, B.E., Gurney, A.L., Spencer, S.A., Darbonne, W.C., Henzel, W.J., Wong, S.C., Kuang, W.C., Oles, K.J., Hultgen, B., Solberg, J. L. A., Goeddel, D.V. and Eaton, D. L. (1994) *Nature*, **369**, 533-538.
- 102) Wendling, F., Maraskovsky, E., Debili, N., Florindo, C., Teepe, M., Titux, M., Methia, N., Breton-Gorius, J., Cosman, D. and Vainchenker, W. (1994) *Nature*, **369**, 571-574.
- 103) Gospodarowicz, D. (1990) *Curr. Top. Dev. Biol.*, **24**, 57-93.
- 104) Gospodarowicz, D. (1991) *Ann. NY Acad. Sci.*, **638** xiii-xvi, 1-8.
- 105) Goldfarb, M. (1996) *Cytokine Growth Factor Rev.*, **7**, 311-325.
- 106) Bikfalvi, A., Han, Z. C. and Fuhrmann, G. (1992) *Blood*, **80**, 1905-1913.
- 107) Han, Z. C., Bikfalvi, A., Bodevin, E. and Shen, Z.X. (in press) *Int. J. Hematol.*
- 108) Bruno, E., Cooper, R. J., Wilson, E. L., Gabilove, J.L., and Hoffman, R. (1993) *Blood*, **81**, 430-435
- 109) Ishibashi, T. and Burstein, S. A. (1986) *Blood*, **67**, 1512-1514.
- 110) Ishibashi, T., Kimura, H., Uchida, T., Kariyone, S., Friese, P. and Burstein S.A. (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **86**, 5953-5957.
- 111) Michael, W.L. and Williams, N. (1981) *Blood*, **58**, 1032-1039.
- 112) Corash, L., Chen, H.Y., Levin, J., Baker, G., Lu, H. and Mok, Y. (1987) *Blood*, **70**, 177-185.
- 113) Corash, L., Levin, J., Mok, Y., Baker, G. and McDowell, J. (1989) *Exp. Hematol.*, **17**, 278-286.
- 114) Hill, R.J., Warren, M. K., Stenberg, P., Levin, J., Corash, L., Drummond, R., Baker, G., Levin, F. and Mok, Y. (1991) *Blood*, **77**, 42-48.
- 115) Dionne, C.A., Jaye, M. and Schlessinger, J. (1991) *Ann. NY Acad. Sci.*, **638**, 161-166.
- 116) Partanen, J., Makela, T.P., Eerola, E., Korhonen, J., Hirvonen, H., C-Welsh, L. and Alitalo, K. (1991) *EMBO J.*, **10**, 1347-1354.
- 117) Cellaiah, A.H., McEwen, D.G., Werher, S., Xu, J. and Omitz, D.M. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 11620-11627.
- 118) Keegan, K., Johnson, D.E., Williams, L.T. and Hayman, M.J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1095-1099.
- 119) Johnson, D.E. and Williams, L.T. (1993) *Adv. Cancer Res.*, **60**, 1-41.
- 120) Metcalf, D., Nicola, N. A. and Gearing, D.P. (1990) *Blood*, **76**, 50-56.
- 121) Carrington, P.A., Hill, R.J., Stenberg, P.E., Levin, J., Corash, L., Schreurs, J., Baker, G. and Levin, F.C. (1991) *Blood*, **77**, 34-41.

- 122) Lotem, J., Shabo, Y. and Sachs, L. (1989) *Blood*, **74**, 1545-1551.
- 122) Sudo, T., Tanaka, R., Kudo, T., Sano, E., Kawano, G. and Nakahata, T. (1992) *Jpn. Soc. Immunol.*, **22**, 187.
- 123) Yoshitomi, S., Kuroshima, K., Nomura, C., Habashita, J. and Kurokawa, T. (1996) *Hybridoma*, **15**, 299-305.
- 124) Sporn, M.B. and Tadaro, G.J. (1980) *N. Engl. J. Med.*, **303**, 878
- 125) Sporn, M.B. and Roberts, A.B. (1985) *Nature (London)*, **313**, 745-747.
- 126) Herdin, C.-H. and Westmark, B. (1984) *Cell*, **37**, 9-20.
- 127) Gazit, A., Igarashi, H., Chiu, I.-M., Srinivasan, A., Vaniv, A., Tronick, S.R., Robbins, K.C. and Aaronson, S.A. (1984) *Cell*, **39**, 89-97.
- 128) Rosenthal, A., Lindquist, P.B., Bringman, T.S., Goeddel, D.V. and Derynck, R. (1986) *Cell*, **46**, 301-309.
- 129) Velu, T.J., Beguinot, L., Vass, W.C., Willingham, M.C., Merlino, G.T., Pastan, I. and Lowy, D.R. (1987) *Science*, **238**, 1408-1410.
- 130) Betsholtz, C., Westmark, B., Ek, B. and Heldin, C.-H. (1984) *Cell*, **39**, 447-457.
- 131) Robbins, K.C., Leal, F., Pierce, J.H. and Aaronson, S.A. (1985) *EMBO J.*, **4**, 1783-1792.
- 132) Wilgier, M., Sweet, R., Sim, G.K., Perlicer, A., Lacy, E., Maniatis, T., Silverstein, S. and Axel, R. (1979) *Cell*, **16**, 777-785.
- 133) Hori, A., Sasada, R., Matsutani, E., Naito, K., Sakura, Y., Fujita, T. and Kozai, Y. (1991) *Cancer Res.*, **51**, 6180-6184.
- 134) Gospodarowicz, D. (1987) *Methods Enzymol.*, **147**, 107-119.
- 135) Coulter, F., Ollendorff, V., Marics, I., Rosnet, O., Batoz, M., Planche, J., Marchetto, S., Pebusque, M.-J., deLapeyriere, O. and Bimbaum, D. (1991) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **638**, 53-61.
- 136) Dickson, C., Fuller-Pace, Kiefer, P., Acland, P., MacAllan, D. and Peters, G. (1991) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **638**, 18-26.
- 137) Goldfaub, M., Bates, B., Druchker, B., Hardis, J. and Haub, O. (1991) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **638**, 38-52.
- 138) Yoshida, T., Sakamoto, H., Miyagawa, K., Sugimura, T. and Terada, M. (1991) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **638**, 27-37
- 139) Aaronson, S.A., Bottaro, D.P., Miki, T., Ron, D., Finch, P.W., Fleming, T.P., Ahn, J., Taylor, W.G. and Rubin, J.S. (1991) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **638**, 62-77.
- 140) Davis, B.D. and Tai, P.-C. (1980) *Nature*, **283**, 433-438.
- 141) Walter, P., Gilmore, R. and Blobel, G. (1984) *Cell*, **38**, 5-8.
- 142) Perlman, D. and Halvorson, H.O. (1983) *J. Mol. Biol.*, **167**, 391-409.
- 143) Garoff, H. (1985) *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1**, 403-445.
- 144) Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) *J. Mol. Biol.*, **157**, 105-132.
- 145) Ocampo S., Colvin, J.S., Chellaiah, A. and Omitz, D.M. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 1726-1731.
- 146) Igarashi, M., Nagata, A., Jinno, S., Suto, K. and Okayama, H. (1991) *Nature (London)*, **353**, 80-83.
- 147) Ono, Y., Kurokawa, T., Fujii, T., Kawahara, K., Igarashi, K., Kikkawa, U., Ogita, K. and Nishizuka, Y. (1986) *FEBS Lett.*, **206**, 347-352.

- 148) Von Heijne, G. (1985) *J. Mol. Biol.*, **284**, 99-105.
- 149) Rosenberg, A.H., Chui, D., Lin, S.-W., Dunn, F. W. and Studier, F.W. (1987) *Gene*, **56**, 125-135.
- 150) Studier, F.W. and Moffat, B.A. (1986) *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130.
- 151) Jelkman, W. (1992) *Physiological Reviews*, **72**, 449-488.